

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Expression génique et délétions de l'ADN mitochondrial lors de la sénescence répllicative et après des stress oxydatifs sublétaux

Frippiat, Christophe

Award date:
1998

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

FACULTES UNIVERSITAIRES
NOTRE-DAME DE LA PAIX



NAMUR

Faculté des Sciences

**EXPRESSION GÉNIQUE ET DÉLÉTIONS DE L'ADN MITOCHONDRIAL
LORS DE LA SÉNESCENCE RÉPLICATIVE ET APRÈS DES STRESS
OXYDATIFS SUBLÉTAUX.**

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques

Christophe FRIPPIAT

Juin 1998

Fm B 8/1998/12

FACULTES
UNIVERSITAIRES
N.-D. DE LA PAIX
NAMUR

Bibliothèque

FMB

4/1992/2

FACULTES UNIVERSITAIRES
NOTRE-DAME DE LA PAIX



NAMUR

Faculté des Sciences

**EXPRESSION GÉNIQUE ET DÉLÉTIONS DE L'ADN MITOCHONDRIAL
LORS DE LA SÉNESCENCE RÉPLICATIVE ET APRÈS DES STRESS
OXYDATIFS SUBLÉTAUX.**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques**

Christophe FRIPPIAT

Juin 1998

UBS 7848602

340479

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet @fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Expression génique et délétions de l'ADN mitochondrial lors de la sénescence répllicative et après des stress oxydatifs sublétaux

FRIPPIAT Christophe

Résumé

Les effets à long terme des stress sublétaux au tert-butylhydroperoxyde ou au peroxyde d'hydrogène sur le comportement des fibroblastes humains en culture, de souche WI-38 et IMR-90, présentent de nombreuses similitudes avec la sénescence répllicative. Toutefois, aucune preuve moléculaire ne venait étayer cette hypothèse.

Dans ce travail, nous montrons une variation similaire du niveau de transcription de différents gènes associés à la sénescence cellulaire, aussi bien après des stress que lors de la sénescence répllicative. Ces similitudes moléculaires étayent l'hypothèse de voies similaires lors du vieillissement normal et accéléré par des stress oxydatifs. Nous montrons aussi que la délétion commune de 4,977 kb de l'ADN mitochondrial est présente chez les cellules âgées *in vitro* et les cellules jeunes soumises à des stress oxydatifs.

Nous mettons aussi en évidence une nouvelle délétion mitochondriale de 4,838 kb, chez les cellules jeunes soumises à des stress oxydatifs successifs. Enfin, nous avons développé une technique de PCR compétitive avec standards internes qui permet de doser les délétions de l'ADN mitochondrial obtenus lors de PCR simplex.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 1998

Promoteur: J.Remacle

Directeur de mémoire: O.Toussaint

*Merci à vous, Professeur Remacle, pour m'avoir ouvert
les portes de votre laboratoire et aidé de vos conseil éclairés.*

*Merci à toi, Olivier Toussaint, pour ton humanité, pour ton
soutien constant dans nos efforts, ton partage de nos joies et de
nos déceptions.*

Merci à toi, Patrick pour les secrets des northern blot.

A toi, Thierry, pour ton aide en informatique.

*A toi, Jean-Jean, véritable clown de service.
Merci à toute l'équipe du vieillissement.*

*Merci, Isabelle Ernest pour ta disponibilité et tes
encouragements*

*Salut, Salut, je voudrais vous dire à tous.....Salut!
Salut à ceux qui m'ont aidé
Salut à ceux qui m'ont fait rire
Salut, Salut, je voudrais vous dire Salut à vous qui m'avez
accueilli !*

Table des matières

Avant-propos

I: Introduction

pages

1) Les théories du vieillissement.....	I-2
1.1) Les théories déterministes.....	I-2
1.2) Les théories stochastiques.....	I-3
2) Biomarqueurs principaux du vieillissement cellulaire.....	I-3
2.1) La sénescence répllicative.....	I-3
2.2) Modifications observées au cours du vieillissement cellulaire <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	I-4
2.2.1) Changements morphologiques.	
2.2.2) Modification histochimique.	
2.2.3) Longueurs des télomères.	
2.2.4) Rôle des mitochondries dans le vieillissement.	
2.2.5) Quelles sont les causes des délétions observées? Hypothèses.	
2.2.6) Synthèse protéique et génique.	
2.2.7) Régulation du cycle cellulaire	
3) Thermodynamique, vieillissement et stress.....	I-13
3.1) La cellule comme système thermodynamique.....	I-13
3.2) Effets des stress: point de vue de la thermodynamique.	I-14
3.3) Effets des stress sublétaux sur le vieillissement cellulaire.....	I-15
4) Projet de recherche.....	I-17

II: Matériels et méthodes

1) Cultures et stress successifs des fibroblastes.....	II-2
1.1) les cellules.....	II-2
1.2) Condition stérile.....	II-2
1.3) Trypsinisation.....	II-2
1.4) Conservation des cellules.....	II-3
1.5) Repiquage des cellules	II-4
1.6) Stress au t-BHP et H ₂ O ₂	II-5

2) Détection de l'activité SA β -galactosidase.....	II-6
3) Extraction de l'ADN mitochondrial.....	II-7
3.1) Récupération des cellules.....	II-7
3.2) Lavage des cellules.....	II-8
3.3) Extraction de l'ADN.....	II-8
4) PCR (réaction en chaîne par polymérase).....	II-9
4.1) ADN polymérase.....	II-10
4.2) Choix des amorces.....	II-10
4.3) Calcul de la température d'hybridation.....	II-11
4.4) Utilisation du DMSO.....	II-11
4.5) Conditions de PCR utilisées.....	II-11
4.6) Nested PCR.....	II-12
4.7) PCR compétitive.....	II-13
4.8) Production des standards internes.....	II-14
5) Clonage.....	II-15
5.1) Souche bactérienne.....	II-15
5.2) Plasmide bactérien.....	II-15
5.3) Ligation dans un vecteur T.....	II-15
5.4) Purification des produits PCR.....	II-16
5.5) Transformation des bactéries.....	II-17
5.6) Les milieux de culture.....	II-17
5.7) Préparation de l'ADN plasmidique.....	II-19
6) Etablissement de profils de restriction.....	II-20
7) Electrophorèse en gel d'agarose.....	II-21
8) Extraction d'ADN en gel d'agarose.....	II-22
9) Electrophorèse en gel de polyacrylamide.....	II-24
10) Northern blot.....	II-25
10.1) Extraction des ARN totaux.....	II-25
10.2) Electrophorèse.....	II-28
10.3) Transfert	II-29
10.4) Marquages des sondes.....	II-31
10.5) Préhybridation, hybridation et lavages des membranes.....	II-32

10.6) Elimination de la sonde.....	II-34
10.7) Conservation des membranes.....	II-34
11) Séquençage.....	II-34

III: Résultats et discussion

1) Délétion de 4977 bp dans l'ADN mitochondrial et vieillissement cellulaire <i>in vitro</i>	III-2
1.1) Mise en évidence de la délétion lors du vieillissement <i>in vitro</i> normal et accéléré par des stress.....	III-3
1.1.1) Mise au point des conditions de stress.....	III-3
1.1.2) Extraction de l'ADN mitochondrial.....	III-4
1.1.3) Mise en évidence de la délétion de 4977 bp.....	III-4
1.2) Quantification de la délétion de 4,977 kb par PCR compétitive.....	III-6
1.2.1) Principe de la PCR compétitive et quantitative utilisée dans ce travail.....	III-6
1.2.2) Productions des standards internes.....	III-7
1.2.3) Nombre de cycles de PCR à utiliser lors des PCR compétitive.....	III-8
1.2.4) Considération des hétéroduplex dans la quantification des signaux.....	III-9
1.2.5) Dosage des délétions dans le cas de la maladie CPEO.....	III-10
2) Variation du taux de transcription de gènes spécifiques du vieillissement normal lors du vieillissement accéléré par des stress oxydatifs.....	III-12
2.1) Effet des stress à l'H ₂ O ₂	III-13

IV) Conclusions et perspectives

V) Annexe

- Amorces utilisées
- Délétions dans le génome mitochondrial connues à ce jour
- Séquençage

VI) Bibliographie

Liste des abréviations

ADN	acide déoxyribonucléique
APS	persulfate d'ammonium
ARNm	acide ribonucléique messenger
ARNt	acide ribonucléique de transfert
BME	basal medium eagle
bp	paire de bases
cdks	kinases dépendantes de cyclines
CPM	coups par minute
DMSO	diméthylsulfoxyde
dNTPs	déoxynucléotides
D0	densité optique
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	éthylène diamine tétraacétate
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
kb	kilo paire de bases
LB	Luria Bertani
MF	morphotype mitotique
µg	microgramme
ml	millilitre
µl	microlitre
µM	micromolaire
MOPS	acide 3-[N-morpholino] propenesulfonique
ng	nanogramme
PBS	phosphate buffer saline
PCR	polymearse chain reaction
PMF	morphotype postmitotique
pRB	protein retinoblastoma
rpm	round per minute
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
SDS	dodécylsulfate de sodium
SSDNA	ADN monobrin
SV 40	virus simien 40
t-BHP	tert-butylhydroperoxide
TEMED	N,N,N',N',-tetraméthyléthylènediamine
UV	ultraviolet
X-gal	5-bromo-4-Chloro-3-indoly β-D-galactopyranoside

AVANT-PROPOS

Tous les jours, progressivement, nous vieillissons. L'espérance moyenne de vie ne cesse d'augmenter. Cependant, ce phénomène n'est pas principalement dû à une meilleure compréhension des mécanismes du vieillissement, mais plutôt à des progrès importants en médecine: amélioration de l'hygiène de vie, création de remèdes puissants contre de nombreuses maladies. On constate en conséquence que la population actuelle est de plus en plus âgée avec des coûts médicaux et sociaux de plus en plus importants. C'est cette constatation qui a amené un développement important de la recherche sur ce vieillissement. On peut résumer le vieillissement en une perte progressive de fonctions que ce soit au niveau de l'organisme, de l'organe ou de la cellule. Mais, quelles sont les causes de ces pertes de fonctions? Comment l'environnement cellulaire module-t-il le vieillissement?

INTRODUCTION

1) Les théories du vieillissement

Les cellules sont des machineries extrêmement complexes. Elles sont composées de plusieurs milliers de constituants reliés entre eux par diverses voies métaboliques. De ce fait, l'étude du vieillissement et le développement de théories précises s'y rapportant apparaissent comme très complexes. En conséquence, une multitude de théories du vieillissement ont été élaborées. Ces théories sont, en général, classées en deux grandes familles: les théories déterministes et les stochastiques.

1.1) Les théories déterministes

L'idée de déterminisme dans le vieillissement suppose l'existence de quelques gènes dont les modulations d'expression forment un programme qui régit l'évolution d'une cellule au cours de sa durée de vie. Certains théoriciens placent ou non la période de différenciation dans le vieillissement.

On aurait donc une succession d'événements programmés conduisant au vieillissement. Un argument en faveur de cette vision a été fourni par Hayflick et Moorehead (1961). Ils ont démontré que les fibroblastes humains cultivés *in vitro* ont une durée de vie proliférative finie. Après une phase de croissance exponentielle, on note, dans la culture, un ralentissement progressif et irréversible du rythme des divisions cellulaires. Finalement, on observe un arrêt complet des mitoses. Ce dernier stade est classiquement appelé « sénescence répllicative ». Cependant, rien n'indique que les modifications observées sont sous la dépendance de facteurs programmés ou non programmés comme par exemple la présence de radicaux libres, comme c'est le cas pour le tissu cutané exposé au rayonnement ultra-violet (Pang, C.-Y. *et al.*, 1994). Des théoriciens sont allés plus loin. Ils proposent que l'absence d'une protection totale contre les dommages générés par l'environnement ferait aussi partie intégrante de cet hypothétique programme déterministe. Selon cette théorie, l'évolution darwinienne aurait sélectionné les individus qui restent les plus sains possible pendant une période de vie s'étalant jusqu'à la fin de la période reproductrice et qui accumulent ensuite des dommages jusqu'à leur mort (Kirkwood, T.B.L. *et al.*, 1996).

Pour la plupart des mammifères, des phénomènes tels que la perte de la capacité de prolifération cellulaire, l'accumulation de lipofuscine, la diminution du nombre de neurones, etc., sont

observables *in vitro*, supposant ainsi des mécanismes communs du vieillissement qui pourraient être partiellement programmés (Holliday, R., 1988).

La théorie génétique de programmation ne doit cependant pas faire oublier la théorie des mutations somatiques ou celle des effets environnementaux qui se retrouvent dans l'axe stochastique décrit ci-dessous.

1.2) Les théories stochastiques

Il s'agit ici de thèses prônant que certains éléments du processus de vieillissement sont soumis au hasard et impliquent l'utilisation de statistiques pour leur compréhension. Ces propositions regroupent principalement les théories environnementales dont la théorie des radicaux libres ou la théorie généralisée des erreurs défendue par Orgel (1973).

Le concept de départ des théories stochastiques est celui des mutations somatiques, à savoir qu'une accumulation de mutations peut se produire et générer des variations physiologiques conduisant au vieillissement. Dérivée de cette idée, la théorie de l'accumulation d'erreurs nous dit que, petit à petit, ces dernières s'accumulent et qu'au-delà d'un certain seuil d'erreurs, la cellule meurt. Par exemple, les radicaux libres peuvent induire des dégâts aux protéines, aux lipides mais aussi à l'ADN. La présence constante de radicaux libres est un argument en faveur des théories stochastiques du vieillissement.

2) Biomarqueurs principaux du vieillissement cellulaire

2.1) La sénescence répllicative

Les cellules humaines normales, non cancéreuses, comme la majorité des cellules eucaryotiques ont un potentiel prolifératif limité. Ce potentiel prolifératif varie suivant le type cellulaire, la souche de cellules ou l'espèce étudiée. Lorsque ce potentiel prolifératif est atteint, les cellules arrêtent de se diviser de manière irréversible. Cependant, elles restent viables et métaboliquement actives pendant une longue période. C'est ce que l'on appelle la sénescence répllicative.

Dans le cas des fibroblastes de poumon sur lesquels nous travaillons, le nombre de doublements cumulatifs de population *in vitro* (CPD's) est de 45 ± 7 . De plus, il a été remarqué que plus les donneurs pour les primo-cultures étaient âgés, plus le nombre de passages en culture réalisés diminuait (Martin, M. *et al.*, 1970).

On retrouve dans le modèle issu des travaux de L. Hayflick et D. Moorehead (1961) trois phases chronologiques successives. La première (MP I) se rapporte à la mise en culture des cellules à partir de biopsies et correspond à une adaptation des cellules à leur nouvel environnement. La phase II est la période ascendante du modèle, où les cellules se divisent exponentiellement. Ensuite, leur vitesse de duplication diminue. Finalement, un arrêt total des divisions est observé en phase III. Il est intéressant de remarquer que ces modifications *in vitro* du potentiel prolifératif des cellules sont également observées lors du vieillissement *in vivo*.

2.2) Modifications observées au cours du vieillissement cellulaire *in vivo* et *in vitro*

De multiples changements s'opèrent au cours du vieillissement cellulaire. Nous développerons tout d'abord les modifications morphologiques, histochimiques et biochimiques. Dans un second point, nous nous intéresserons plus particulièrement aux altérations des génomes nucléaire et mitochondrial. Le troisième point a pour objet les changements de l'expression de gènes qui accompagnent le processus de vieillissement cellulaire.

2.2.1) Changements morphologiques

Pour des fibroblastes de poumon observés en microscopie optique, sept morphotypes cellulaires différents ont été définis, chaque morphotype étant issu du précédent. Il s'agit là d'un classement et le passage d'une forme à l'autre pourrait être progressif bien qu'aucun argument expérimental n'ait pu le confirmer.

Dans les cultures de fibroblastes prélevés à partir d'une biopsie de peau réalisée chez un individu jeune, on trouve principalement les trois premiers morphotypes qui se divisent activement (morphotypes I, II, III). A l'opposé, dans les cultures issues de biopsies réalisées chez des individus âgés, on trouve des fibroblastes postmitotiques. Il s'agit de cellules plus étendues en surface et plus larges classées en trois morphotypes différents (morphotypes IV, V,

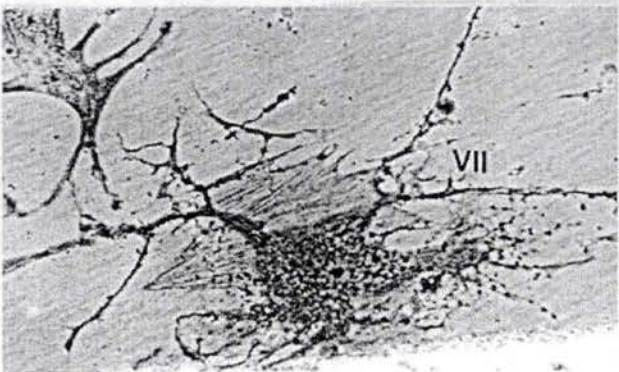
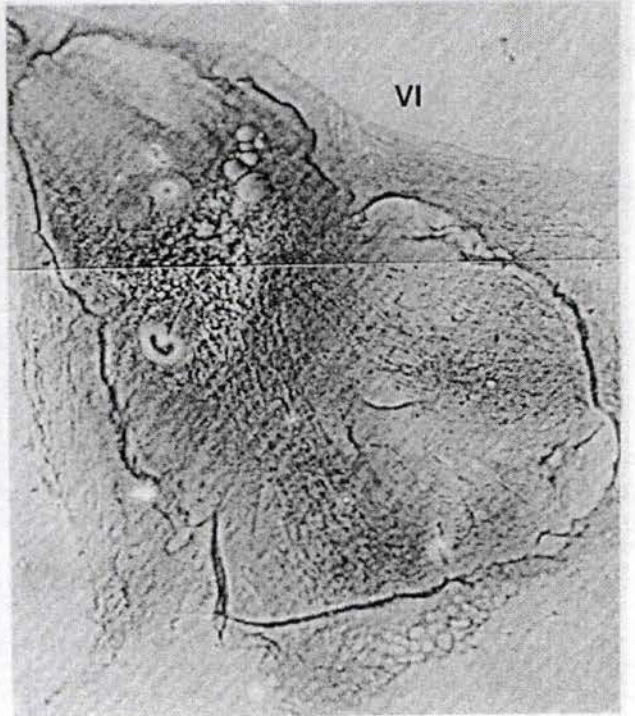
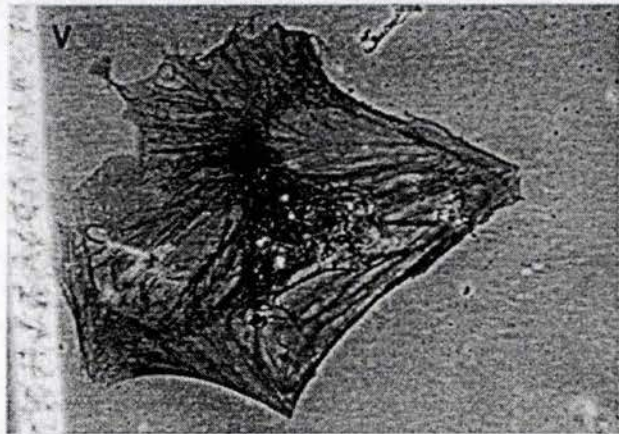
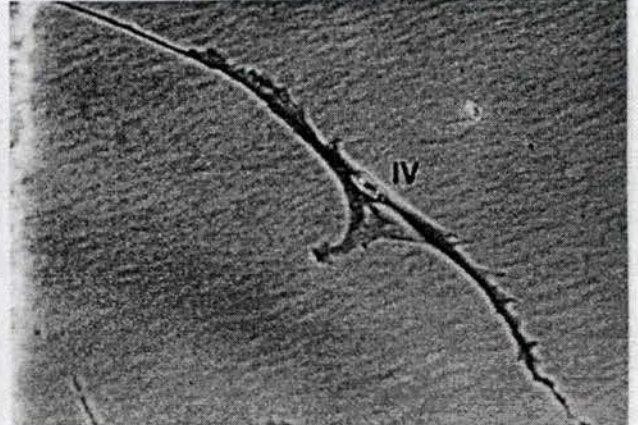
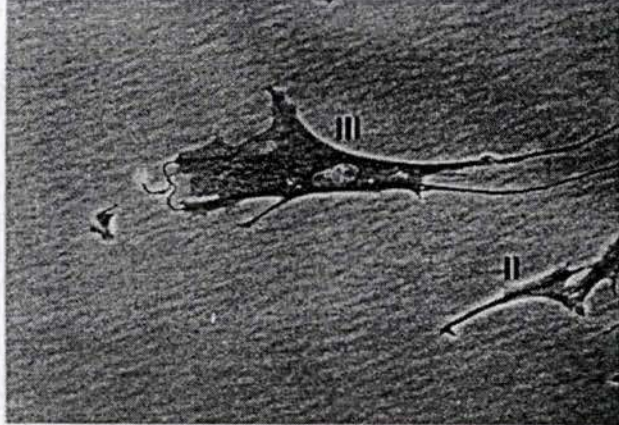
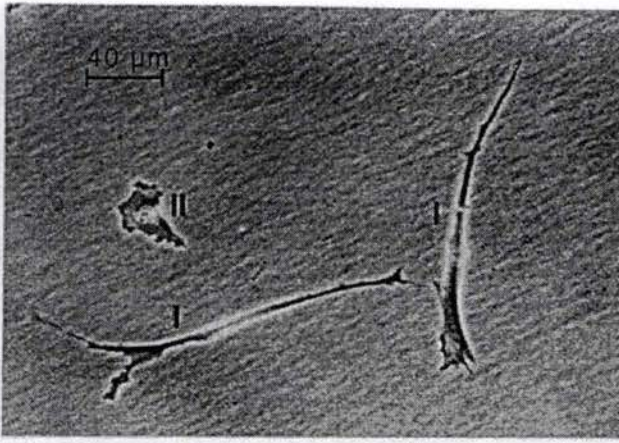


Figure I-1: Morphotypes mitotiques et postmitotiques des fibroblastes humains de poumon foetal . (1) fibroblaste mitotique MF I, (2) fibroblaste mitotique MF II, (3) fibroblaste mitotique MF III, (4) fibroblaste post-mitotique PMF IV, (5) fibroblaste post-mitotique PMF V, (6) fibroblaste post-mitotique PMF VI, (7) morphotype post-mitotique PMF VII.

VI) selon leur taille et leur forme. Le dernier morphotype correspond à des cellules nécrotiques et est très rarement observé (morphotype VII). Dans les biopsies, on constate en effet que la proportion des morphotypes postmitotiques augmente avec l'âge du donneur de l'échantillon.

Les morphotypes I à VII sont montrés sur la figure I-1 (verso page I-4). Le morphotype MF I (MF: Mitotic Fibroblast) est le plus petit, il a une forme de fuseau effilé. Les fibroblastes de type II (MF II) sont des cellules de petite taille et d'aspect triangulaire. Les MF III sont des cellules de plus grande taille. Les PMF IV (PMF: PostMitotic Fibroblast) sont plutôt de longues cellules effilées et crénelées tandis que les morphotypes V et VI (PMF V et VI) représentent de grandes cellules pléiomorphes. Ces derniers morphotypes ne se distinguent que par leur taille, les plus grandes étant les PMF VI (Bayreuther, K. *et al.*, 1988a).

In vitro, les proportions relatives des différents morphotypes au sein d'une culture de fibroblastes dépendent de l'âge de la culture exprimé en doublements cumulatifs de population. L'évolution des morphotypes en culture est assez drastique. Au vingt-cinquième passage en culture, on peut constater que les fibroblastes de morphotype I représentent encore environ 55 % de la population cellulaire, les morphotypes II représentent déjà environ 35%. A partir du passage en culture trente, ils vont disparaître au profit des morphotypes III. Les morphotypes postmitotiques, s'accumulent lors des derniers passages en culture.

Lors d'expériences d'électrophorèses en deux dimensions, il a été mis en évidence que chacun de ces morphotypes a une expression protéique qui lui est propre.

Ces modifications morphologiques se sont révélées être un modèle puissant dans l'étude du processus de vieillissement accéléré par les stress sublétaux (Toussaint, O. *et al.*, 1998).

2.2.2) Modification histochimique (activité Beta-galactosidase associée à la sénescence)

Il existe une activité β -galactosidase associée à la sénescence (SA- β -gal). Les cellules possédant cette activité se colorent en bleu à pH 6,0 lorsqu'on les place en présence d'un substrat artificiel, le 5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl β -D-galactopyranosine (X-gal).

Cette activité SA- β -gal (senescence-associated β -gal) est présente dans les cellules sénescents et ne se retrouve ni dans les cellules immortalisées ni dans les cellules jeunes normales. Le test a

aussi été réalisé sur des biopsies de peau de personnes âgées. Cette activité SA β -gal a été mise en évidence dans les cellules de biopsies de personnes âgées, ce qui conforte l'idée que la sénescence cellulaire se déroule aussi durant le vieillissement de l'organisme et que les cellules sénescents s'accumulent avec l'âge dans les tissus (Dimri, G.P. *et al.*, 1995).

La SA β -gal est un marqueur qui est détectable au moins dans les fibroblastes, les cellules endothéliales et les kératinocytes humains sénescents en culture et *in vivo*.

2.2.3) Longueur des télomères

Les télomères sont des parties non codantes du génome nucléaire situées aux deux extrémités des chromosomes. Ils sont long de plusieurs kilobases et sont constitués par la répétition d'une courte séquence consensus qui varie selon l'espèce étudiée. Chez l'homme, il s'agit de TTAGGG. On émet actuellement l'hypothèse que les télomères pourraient agir comme une sorte de compteur biologique. En effet, leur longueur diminue au cours des divisions cellulaires. D'après la théorie télomérique du vieillissement, lorsque un ou plusieurs télomères atteignent une longueur critique, la cellule deviendrait alors sénescence. On ne connaît pas encore le mécanisme par lequel la longueur des télomères induirait la perte de capacité proliférative. Un modèle est qu'un télomère long bloquerait la transcription d'un inhibiteur de croissance tandis qu'un court l'activerait (Campisi, J. *et al.*, 1996).

En ce qui concerne les cellules sexuelles et les cellules tumorales, elles ont une activité télomérase qui, à chaque division cellulaire, répare les télomères permettant ainsi un potentiel prolifératif infini. Cette enzyme possède un fragment d'ARN qui se place sur l'extrémité du chromosome et sert d'amorce pour la télomérase.

Des expériences récentes de transfections de cellules humaines par un vecteur codant pour la sous-unité catalytique de la télomérase, montrent que, par ce procédé, on augmente significativement la durée de vie proliférative des cellules transfectées, c'est-à-dire, le nombre de passage en culture qu'elles réalisent *in vitro* (Bodnar, A.G. *et al.*, 1998).

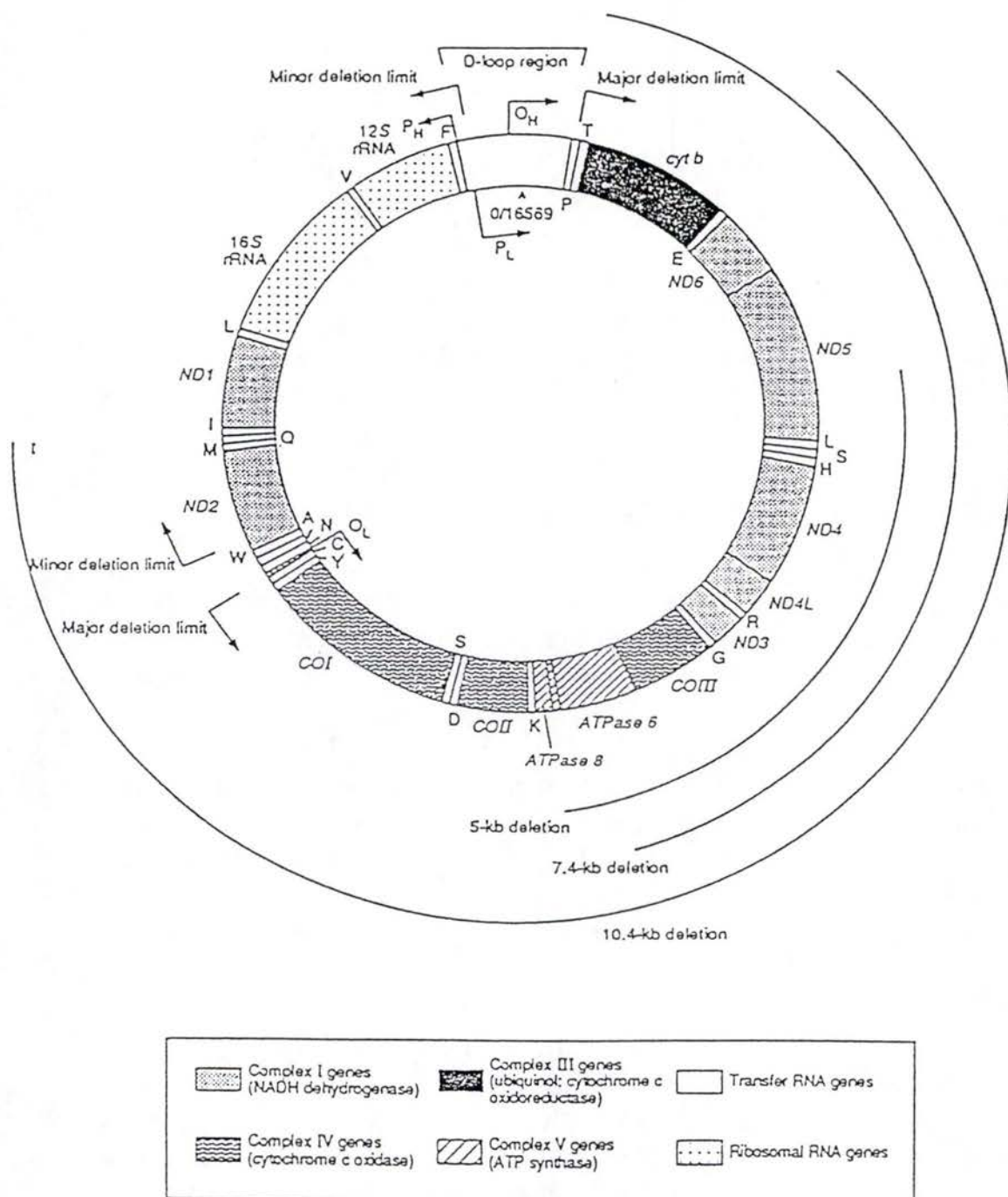


Figure I-2: Carte du génome mitochondrial humain. Les régions ombrées indiquent la localisation des gènes et des ARN r. Ces gènes sont ponctués par des gènes d'ARN t (zones claires) qui s'associent avec l'acide aminé indiqué par l'abréviation adjacente: A (Ala); C (Cys); D (Asp); E (Glu); G (Gly); H (His); I (Ile); K (Lys); L (Leu); M (Met); N (Asn); P (Pro); Q (Gln); R (Arg); S (Ser); T (Thr); V (Val); W (Trp) et Y (Tyr). P_H et P_L sont des promoteurs. Les délétions les plus communes sont représentées par les arcs de cercle. L'arc le plus interne correspondant à la délétion d'environ 5 kb (4977 bp) (Douglas C. Wallace, Sciences, 1992).

2.2.4) Rôle des mitochondries dans le vieillissement

Pour l'ensemble de leurs fonctions, les cellules ont besoin d'énergie. Cette énergie est principalement fournie par les mitochondries sous forme d'ATP.

Les phosphorylations oxydatives se déroulent dans la membrane mitochondriale et génèrent 36 ATP par molécule de glucose alors que la glycolyse seule n'en donne que deux (Rawn, J.D., 1990).

Les mitochondries sont donc des organites d'une importance fondamentale pour la survie de la cellule. Chaque cellule possède un grand nombre de mitochondries. Ce nombre est propre à chaque type cellulaire. Il dépend de ses besoins énergétiques spécifiques et ses fonctions. Par exemple, un hépatocyte possède jusqu'à 2500 mitochondries.

Toute altération des mitochondries (Ozawa, T. *et al.*, 1991) peut conduire à des troubles cellulaires graves. Ces organites possèdent leur propre génome, circulaire et de 16569 bp (figure I-2, verso page I-6), codant pour une partie des protéines impliquées dans la production d'ATP. Le génome mitochondrial ne possède pas d'histone, ce qui le rend plus instable que le génome nucléaire. De plus, il n'y a pas de système de réparation de l'ADN mitochondrial. Enfin, suite à sa fonction, la mitochondrie génère continuellement des radicaux libres qui peuvent altérer l'ADN mitochondrial. Celui-ci est donc particulièrement prédisposé à des modifications de toutes sortes. Certains auteurs ont en effet montré que le génome mitochondrial subit d'importants dégâts d'origine radicalaire lors du vieillissement et que ces dommages sont beaucoup plus élevés que dans le génome nucléaire (Lee, H.-C. *et al.*, 1997).

De nombreuses mutations ponctuelles et délétions sont détectées dans l'ADN mitochondrial. Nous nous limiterons ici à la description brève des délétions. Il s'agit le plus souvent de délétions de grande ampleur allant jusqu'à 10,4 kb. Celles-ci rendent inopérant le flux d'électrons au travers de la chaîne mitochondriale des transporteurs d'électrons. Cependant, chaque mitochondrie contient plusieurs copies de son génome et chaque cellule contient de nombreuses mitochondries. On comprend dès lors que ce n'est pas tellement la présence de délétions en tant que telle qui est dangereuse, mais plutôt sa fréquence par cellule. Si un faible nombre de délétions a lieu dans quelques mitochondries d'une cellule, les autres mitochondries compenseront un manque éventuel de synthèse d'ATP par une augmentation de leur respiration individuelle. L'accumulation de délétions, au cours du vieillissement,

affecte surtout les fonctions des cellules différenciées, post-mitotiques et à haut besoin énergétique tels que les neurones et les cellules musculaires.

De nombreuses études réalisées sur différents échantillons de tissus ont montré que sa fréquence augmente durant le vieillissement *in vivo*. Ces études portent sur des biopsies de la peau (Pang, C.-Y., *et al.*, 1994; Yang, J.H. *et al.*, 1994), de muscle squelettique (Lee, H.-C. *et al.*, 1994), de coeur, de rein (Liu, V.W.S. *et al.*, 1998), de poumon (Fahn, H.J. *et al.*, 1996), le foie (Yen, T.-Z. *et al.*, 1991) et du cerveau humain (Corral-Debrinski, M. *et al.*, 1992).

Dans le cas du coeur, du rein et du muscle squelettique (figure I-3, cette page), on observe une augmentation de l'abondance des délétions en corrélation avec l'avancée en âge. L'abondance est définie comme étant le nombre d'ADN mitochondriaux délétés par rapport au nombre total d'ADN mitochondriaux. On constate aussi que cette abondance n'est pas uniforme, montrant une accumulation différentielle en fonction des tissus.

Pour exprimer l'abondance des délétions en fonction de l'âge, le logarithme naturel de l'abondance a été exprimé en fonction de celui-ci. Les graphes de la figure I-3 et les droites de régression indiquent que les délétions s'accumulent avec l'âge mais aussi que cette abondance est variable selon les tissus examinés.

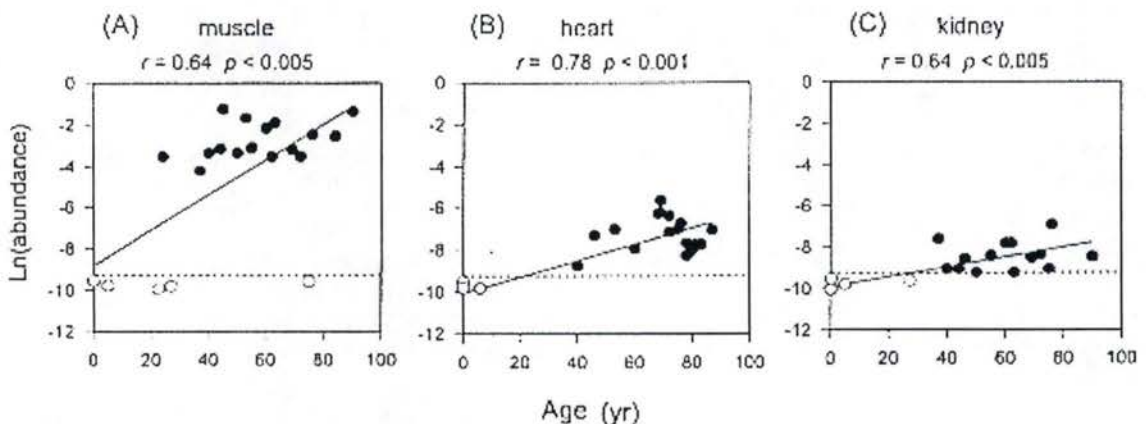


Figure I-3 : Accumulation de la délétion de 4977 bp avec l'âge dans le muscle, le coeur et le rein. Les cercles noirs représentent les pourcentages mesurés de la délétion et les cercles clairs indiquent les échantillons où aucune délétion n'est détectable (Liu, V.W.S., *et al.*, 1998).

L'abondance des délétions semble être la plus forte chez les cellules à faible potentiel prolifératif et à haute demande énergétique.

Toutefois, on suppose aussi que la fonction spécifique du type cellulaire étudié peut intervenir. Ainsi, les poumons sont en contact

LES MALADIES MITOCHONDRIALES

Cette liste des maladies causées par des mutations de l'ADN mitochondrial n'est pas exhaustive. Certaines de ces maladies peuvent résulter de mutations nucléaires ou d'autres mécanismes qui perturbent le fonctionnement des mitochondries.

MALADIE	CARACTÉRISTIQUES
Maladie d'Alzheimer	Perte progressive des capacités cognitives
Ophtalmoplégie externe progressive chronique	Paralysie des muscles oculaires réduisant la mobilité des yeux et myopathie d'origine mitochondriale (<i>voir ci-dessous</i>)
Diabète sucré	Concentration sanguine en sucre élevée entraînant diverses complications
Dystonie	Mouvements anormaux, rigidité musculaire ; souvent dégénérescence des noyaux gris centraux du cerveau
Syndrome de Kearns-Sayre	Paralysie des muscles oculaires et myopathie, associées à des troubles tels que détérioration de la rétine, maladie cardiaque, surdité, diabète et insuffisance rénale
Syndrome de Leigh	Perte progressive des capacités motrices et verbales et dégénérescence des noyaux gris centraux ; maladie de l'enfance potentiellement mortelle
Maladie de Leber	Cécité temporaire ou permanente due à une lésion du nerf optique
Syndrome MELAS (encéphalomyopathie mitochondriale, acidose lactique et accidents vasculaires cérébraux)	Fonctionnement anormal du tissu cérébral, entraînant des crises d'épilepsie, des paralysies locales temporaires et une démence, associé à une myopathie mitochondriale et une acidose du sang
Épilepsie myoclonique	Crises d'épilepsie associées à une myopathie mitochondriale (<i>voir ci-dessous</i>) ; surdité et démence possibles
Myopathie mitochondriale	Détérioration des muscles, qui se manifeste par une grande faiblesse, surtout à l'effort ; les muscles présentent souvent des fibres rouges en lambeaux, contenant des mitochondries anormales et se colorant en rouge au contact d'un réactif spécifique
Syndrome NARP (faiblesse musculaire neurogène, ataxie et rétinite pigmentaire)	Perte de la force et de la coordination musculaire, accompagnée d'une dégénérescence cérébrale locale et d'une détérioration de la rétine
Syndrome de Pearson	Anomalie du fonctionnement de la moelle osseuse chez l'enfant (entraînant une perte des cellules sanguines) et insuffisance pancréatique ; les sujets qui survivent évoluent souvent vers un syndrome de Kearns-Sayre

Figure I-4: Liste non exhaustive de maladies où les mitochondries sont impliquées (Wallace, D.C., 1997).

avec une atmosphère contenant 20 pourcent d'O₂, sans exclure la présence éventuelle d'agents nocifs inhalés, ce qui pourrait augmenter les dommages.

De plus, on a pu établir une corrélation entre une diminution de l'activité de certaines enzymes de la chaîne respiratoire, codées par le génome mitochondrial, et la présence de la délétion de 4977 bp qui est une des plus communes (Lezza, A.M.S. *et al.*, 1994).

Outre le vieillissement, de nombreuses maladies (Wallace, D.C., 1992) sont associées plus ou moins directement à des altérations dans le génome mitochondrial (figure I-4, verso page I-8). La première maladie découverte, en 1988, est la neuropathie de Leber (LHON). Il s'agit d'une forme de cécité bilatérale due à une diminution de la production d'ATP par les mitochondries dans les neurones (Oostra, R.-J. *et al.*, 1995). Dans certaines maladies dégénératives telles que la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson, maladies liées à l'âge, on a pu observer une diminution de la production d'énergie pour les nerfs et les muscles. De plus, si l'on introduit dans des cellules saines de l'ADN mitochondrial de cellules provenant d'individus atteints de la maladie d'Alzheimer, on observe une utilisation incorrecte des électrons dans la respiration des mitochondries: la production de radicaux libres est augmentée et la régulation de la concentration interne en calcium est perturbée, calcium qui intervient dans la communication intercellulaire (Davis Parker, W. and Davis, R.E., 1997; Wallace, D.C., 1992; Wallace, D.C., 1997).

2.2.5) Quelles sont les causes des délétions observées ? Hypothèses

Actuellement, il n'existe aucune preuve formelle pouvant trancher en faveur d'un mécanisme unique.

Certaines hypothèses proposent que les radicaux libres sont impliqués dans la formation de ces délétions, suite à la sensibilité du génome mitochondrial aux attaques radicalaires. On a, par exemple, observé que pour un individu donné, les délétions sont plus fréquentes dans des parties de la peau exposées à la lumière, et donc au rayonnement U.V. au cours de la vie (Pang, C.-Y., *et al.*, 1994). De plus, Filser *et al* (1997) ont montré que les délétions s'accumulent plus dans les tissus produisant de fortes quantités d'ATP, donc plus de radicaux.

D'autres hypothèses sont basées sur la formation de structures secondaires suivies d'une coupure. Il a en effet été constaté qu'il existe des duplications de gènes dans l'ADN mitochondrial (Wallace,

Gene/protein	Description/function	References
Cathepsin B	Protease	DiPaolo <i>et al.</i> (1992)
Collagen, $\alpha 1, 2$ (I)	Extracellular matrix component	Murano <i>et al.</i> (1991)
Collagenase	Protease; extracellular matrix remodeling	West <i>et al.</i> (1989); Millis <i>et al.</i> (1992)
Cyclins E and D	Regulatory components of cdks	Dulic <i>et al.</i> (1993)
EFl α	Protein synthesis elongation factor	Giordano <i>et al.</i> (1989)
Fibronectin	Extracellular matrix component	Porter <i>et al.</i> (1990); Murano <i>et al.</i> (1991)
IGFBP-3	Insulin-like growth factor binding protein	Murano <i>et al.</i> (1991)
IL-1	Interleukin-1 α and -1 β cytokines	Kumar <i>et al.</i> (1992)
p21 (sdil)	Cyclin-dependent kinase inhibitor	Noda <i>et al.</i> (1994)
SAG	Senescence-associated gene, function unknown	Wistrom and Villeponteau (1992)
Statin	Nuclear protein, associates with pRb	Wang (1985)
Stromelysin	Protease; extracellular matrix remodeling	Millis <i>et al.</i> (1992)
WS3-10	Calcium binding protein	Liu <i>et al.</i> (1994a,w)

Figure I-5 a : Exemple de gènes dont l'expression augmente chez les fibroblastes humains sénescents (Campisi, J. *et al.*, 1996).

Gene/protein	Description/function	Expression	References
cdk2	Cyclin-dependent protein kinase-2	G1	Afshari <i>et al.</i> (1993)
cycA	Cyclin A, activator of cdk kinase	Late G1	Stein <i>et al.</i> (1991); Afshari <i>et al.</i> (1993)
cycB, cdc2	Active cdc2 kinase components	G2/M	Stein <i>et al.</i> (1991)
DHFR	Dihydrofolate reductase	Late G1/S	Pang and Chen (1993, 1994)
E2F1	Component of E2F transcription factor	Mid-late G1	Dimri <i>et al.</i> (1994)
EPC1	Serine protease inhibitor	G0	Pignolo <i>et al.</i> (1993)
c-fos	Component of AP-1 transcription factor	Early G0/G1	Seshadri and Campisi (1990)
gas1, gas6	Growth arrest-specific genes	G0	Cowled <i>et al.</i> (1994)
his2a,2b,3,4	Replication-dependent histones	Late G1/S	Zambetti <i>et al.</i> (1987); Seshadri and Campisi (1990)
hsp70, 90	Heat shock proteins 70 and 90	Stress-inducible late G1/S	Liu <i>et al.</i> (1989); Choi <i>et al.</i> (1990); Luce and Cristofalo (1992)
Id1, Id2	Inhibitors of bHLH transcription factors	Early and mid-G1	Hara <i>et al.</i> (1994)
IGF1	Insulin-like growth factor-1	G1	Ferber <i>et al.</i> (1993)
IL-6	Interleukin-6 multifunctional cytokine	G1	Goodman and Stein (1994)
L7	Large ribosomal subunit protein	Constitutive	Seshadri <i>et al.</i> (1993)
mig-5	Tissue inhibitor of metalloproteinase	G0/G1	Wick <i>et al.</i> (1994)
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen/ DNA polymerase δ function	Late G1/S	Chang <i>et al.</i> (1991)
pola	DNA polymerase α	Late G1/S	Pendergrass <i>et al.</i> (1991)
RNR	Ribonucleotide reductase	Late G1/S	Pang and Chen (1993, 1994)
TIMP-1	Tissue inhibitor of metalloproteinase	G0	West <i>et al.</i> (1989); Millis <i>et al.</i> (1992)
TK	Thymidine kinase	Late G1/S	Pang and Chen (1993, 1994)
TS	Thymidylate synthetase	Late G1/S	Pang and Chen (1993, 1994)

Figure I-5 b : Exemple de gènes dont l'expression diminue chez les fibroblastes humains sénescents (Campisi, J. *et al.*, 1996).

D.C., 1997). Ces duplications par appariement puis recombinaison interne résolue erronément par une topoisomérase conduiraient à la délétion. De plus, il existe, de part et d'autre de la délétion de 4977 kb, des séquences directement répétées qui pourraient être responsables de l'élimination durant la réplication du génome mitochondrial (Baumer, A. *et al.*, 1994; Lestienne, P., 1992).

2.2.6) Synthèse protéique et génique

De manière globale, on a observé que les taux de synthèse de protéine et d'ADN diminuent au cours du vieillissement. En ce qui concerne les protéines, on a observé, en utilisant de la [³⁵S]-méthionine, une diminution de la quantité de protéines synthétisées par unité de temps.

Dans le cas de l'ADN, l'incorporation de [³H]-thymidine a aussi permis de mettre en évidence une diminution de la synthèse d'ADN par unité de temps chez les cellules âgées.

De manière particulière, on observe des variations plus marquées chez les cellules âgées de l'expression de certains gènes, avec des augmentations ou des diminutions d'expression de gènes particuliers (figure I-5, verso page I-9).

2.2.7) Régulation du cycle cellulaire

L'arrêt définitif de la division cellulaire lors de la sénescence répliquative se fait en phase G1 du cycle cellulaire, empêchant le passage en phase S, phase pendant laquelle l'ADN est répliqué. Cet arrêt n'est pas dû à un blocage généralisé des voies de transduction du signal des facteurs de croissance, mais plutôt à l'inhibition de quelques gènes inductibles par les facteurs de croissance et réprimés dans les cellules sénescents. On connaît au moins quatre facteurs impliqués dans cet arrêt définitif de prolifération.

Les gènes de réponses précoces:

Les gènes *c-fos*, *Id1* et *2* sont des gènes de réponse précoce. Ils permettent la transcription d'autres gènes tels que *e2f*, les cyclines (CdC) et les kinases dépendantes de cyclines (CdK). Chez les cellules âgées, il a été constaté une forte diminution du niveau de transcription des gènes *c-fos*, *Id1* et *2*.

AP-1 est un facteur de transcription dimérique formé de *c-Fos* et de *c-Jun* et nécessaire entre autre à la réponse cellulaire aux stress et aux facteurs de croissance. *Id1* et *Id2* sont aussi des gènes

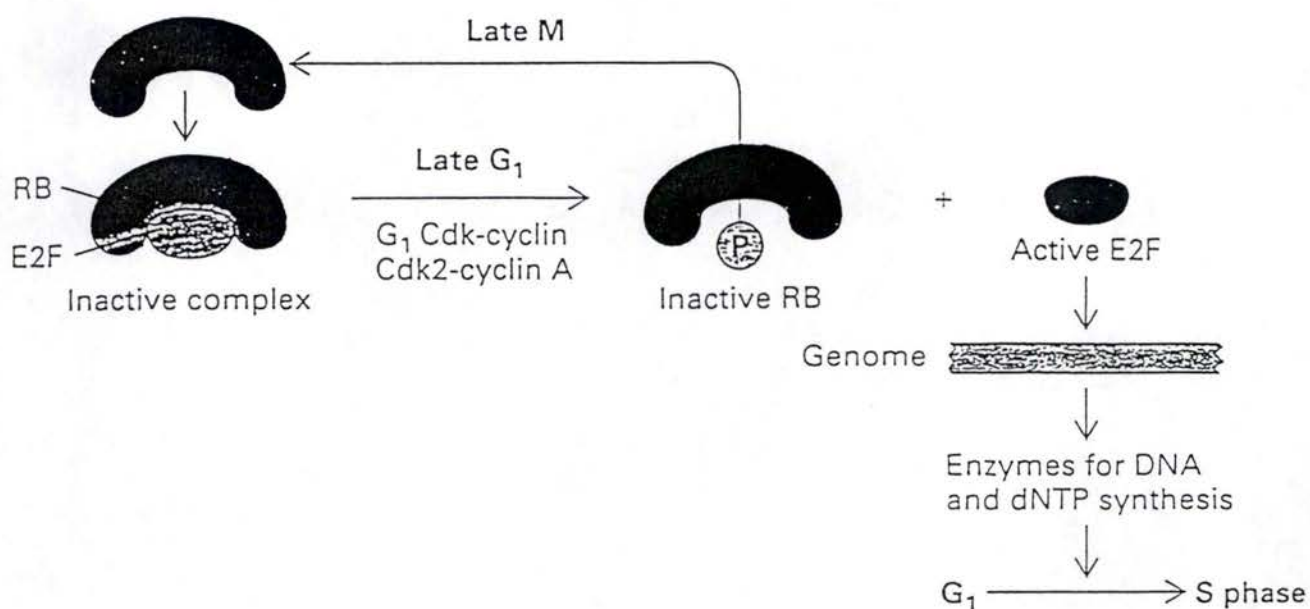


Figure I-6: Sous sa forme phosphorylée, pRB forme un complexe inactif avec E2F. Dans la phase G₁, pRB est hyperphosphorylée par des complexes cyclines-Cdks, ce qui empêche sa liaison à E2F. Cela rend l'entrée en phase S possible normal (Lodish, H., *et al.*, 1995).

de réponse précoce. Ils codent pour des régulateurs négatifs de facteurs de transcription hélice-boucle-hélice.

SRE (Serum Responsible Element) est une petite séquence faisant partie du promoteur de *c-fos*. Chez les cellules jeunes, SRE est reconnu par le facteur SRF (Serum Responsible Factor) induisant ainsi la transcription de *c-fos*. Mais, avec l'âge, SRF devient hyperphosphorylé et ne peut plus se fixer sur SRE. Il en résulte une absence de *c-fos*. En ce qui concerne *Id 1* et *2*, le blocage de leur transcription n'est pas encore élucidé.

Répression de gènes de la phase G1 du cycle cellulaire via E2F:

Le second type de mécanisme est la répression de gènes induits en phase G1. Les cellules sénescents sont déficientes en E2F, un facteur de transcription hétérodimérique essentiel pour l'induction de gènes impliqués dans les phases G1 et S du cycle cellulaire. L'activité de E2F serait nécessaire à la synthèse de l'ADN car il activerait la transcription de divers gènes codant pour des enzymes impliqués dans la synthèse des nucléotides.

Lorsque E2F est synthétisé, il est inactif car couplé à la protéine pRB (protéine de rétinoblastome). La phosphorylation de pRB par les Cdk's permet le relargage de E2F. Cette phosphorylation n'a plus lieu chez les cellules âgées (figure I-6, verso page I-10).

De plus, on observe une déficience de la synthèse de E2F qui est partiellement due à la répression de E2F1, un facteur de transcription permettant la synthèse de E2F.

Les cyclines et Cdk's:

En troisième lieu, il a été observé une répression de l'expression de certaines cyclines (CdC) et kinases dépendantes de cyclines (CdK) nécessaires à la progression en G1 et G2. Ces enzymes, pour certaines, sont sous la dépendance de E2F (figure I-7, verso page I-11).

Inhibiteurs de croissance (anti-oncogènes):

Ce dernier point concerne des inhibiteurs de croissance tels pRB, p53 et p21 (figure I-8, verso page I-12) qui peuvent être exprimés constitutivement chez les cellules âgées à *contrario* des cellules tumorales. On y retrouve notamment pRB qui, lorsqu'elle est active, titre E2F. Lors de la mitose, pRB est phosphorylée, permettant le relargage de E2F. Cette phosphorylation n'a plus lieu

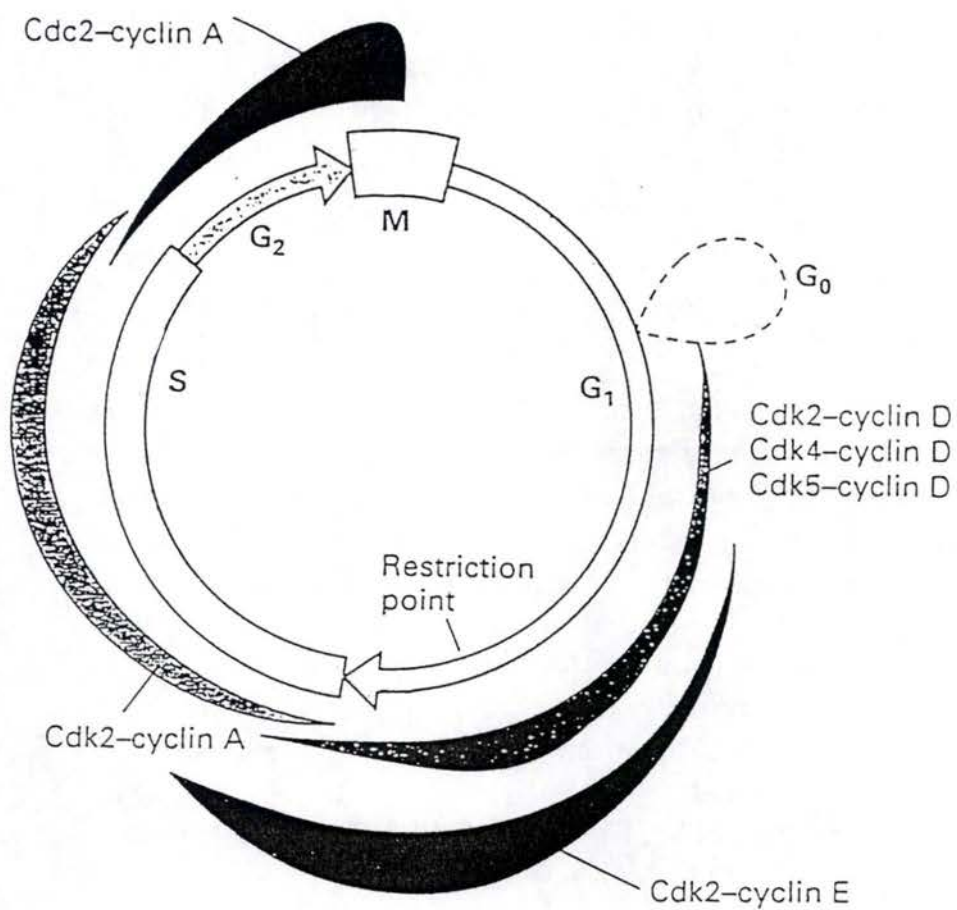


Figure I-7: Intervention des complexes cyclines-Cdks dans le déroulement du cycle cellulaire normal (Lodish, H. *et al.*, 1995).

chez les cellules âgées. Dans de nombreux cancers, pRB est muté, l'activation du cycle cellulaire devient alors permanente.

La répression de p53 est aussi nécessaire pour que la division cellulaire puisse avoir lieu car cette protéine active la transcription de p21 (waf-1). p21 est un inhibiteur de la croissance cellulaire qui à la capacité de se lier aux complexes cyclines-Cdks. La liaison de p21 à ces complexes les inhibe. Une des conséquences majeures est la non phosphorylation de pRB par ces complexes cyclines-Cdks. Les cellules ne sont donc plus capable de réaliser la phase S du cycle cellulaire. p21 est exprimé constitutivement chez les cellules sénescents et réalise donc un blocage permanent du cycle cellulaire. La transcription de p53 est négativement régulée par le produit du gène *mdm2* qui n'est plus exprimé lors du vieillissement (Pour une revue: (Toussaint, O., *et al.*, 1998)).

Il existe donc de nombreux mécanismes mais il apparaît improbable que chacune de ces voies soit indépendamment contrôlée.

Le problème actuel est d'élucider complètement la relation entre ces différents mécanismes et de savoir comment ils génèrent le phénotype dominant d'incapacité à entrer en phase S (Campisi, J., *et al.*, 1996).

Pour ce faire Gonos *et al.* ont transformé des fibroblastes de rat (cellule tsa) par un antigène T thermosensible du virus SV-40 (Gonos, E.S. *et al.*, 1998). Cette transformation immortalise les cellules si elles sont maintenues à 33°C. Toutefois, à une température de 39°C cette immortalisation est annihilée et les cellules semblent entrer en état de sénescence au niveau morphologique et prolifératif. Après réalisation d'une banque de cDNA à partir des ARNm d'une population de cellules placées à 39°C, une hybridation soustractive a été réalisée entre ces cDNA et l'ARNm des cellules mises à 33°C permettant la suppression des gènes exprimés de la même manière aux deux températures.

Cette méthode a permis d'isoler une dizaine de séquences présentant une expression différentielle chez les cellules tsa à 39°C par rapport aux mêmes cellules à 33°C. Les gènes suivants ont été trouvés comme étant surtranscrits chez les cellules tsa ayant subi un arrêt irréversible de la croissance cellulaire à 39°C: la sous-unité quatre de la cytochrome c oxydase, SS9, la fibronectine, ostéonectine apolipoprotéine J et l' $\alpha(1)$ procollagène SM 22 et la sous-unité IV de la GTP binding protein (protéine de liaison au GTP).

La fibronectine et l'ostéonectine et l' $\alpha(1)$ procollagène sont des protéines de la matrice extracellulaire. La cytochrome oxydase intervient dans le métabolisme énergétique mitochondrial.

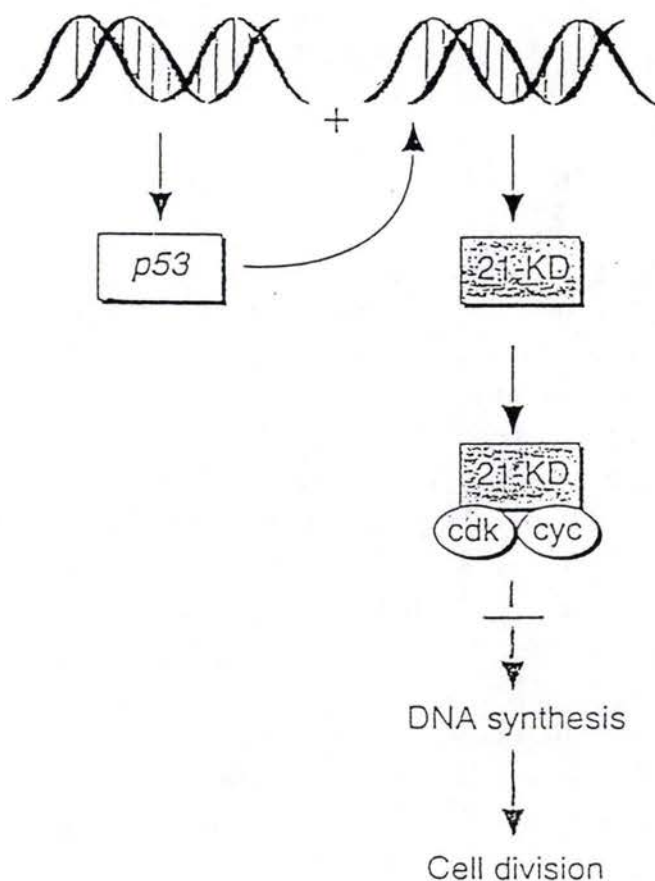


Figure I-8: Schématisation de l'activation de p21. Le facteur de transcription p53 se lie au promoteur des gènes codant pour p21 et active sa transcription. La protéine p21 agit comme un inhibiteur d'une série de complexes cyclines-Cdks en s'y liant.

3) Thermodynamique, vieillissement et stress (Toussaint, O. *et al.*, 1991)

3.1) La cellule comme système thermodynamique

La cellule, dans son ensemble, est un système autoorganisé qui entre dans le domaine d'application de la thermodynamique des systèmes irréversibles loin de l'équilibre, thermodynamique qui étudie les systèmes ouverts autorégulés.

Le maintien de ce type de systèmes est dû aux transformations physico-chimiques ou biochimiques qui s'y produisent, donnant lieu à une production d'entropie dont le niveau dépend directement de l'intensité des transformations. On peut donc dire qu'elle représente le niveau du métabolisme cellulaire, définissable dans ce cas comme l'ensemble des réactions métaboliques de production et d'utilisation d'énergie libre sous toutes ses formes, qu'il s'agisse de nucléotides triphosphates ou du potentiel rédox, etc... Cette notion de niveau de production d'entropie recouvre la notion d'efficacité métabolique dans la cellule: plus l'efficacité baisse, plus la production d'entropie, tout d'abord interne puis exportée hors du système, va diminuer.

En règle générale, la cellule tente de rester à son minimum de production d'entropie. Cependant, la thermodynamique des systèmes ouverts nous apprend qu'il peut exister, pour un même système, divers niveaux de production d'entropie qui représentent des minima différents, apparaissant suivant des paramètres internes ou externes au système.

En ce sens, la théorie du vieillissement basée sur la thermodynamique des systèmes ouverts loin de l'équilibre permet de prévoir ce qui arrive au système cellulaire lorsqu'il est soumis à des variations de paramètres environnementaux, comme un stress ou une stimulation, ou des variations de paramètres internes.

La situation obtenue dans ces conditions serait simple si la cellule était un système proche de l'équilibre: sa production d'entropie augmenterait momentanément pendant que les paramètres internes qui ont été perturbés se rééquilibreraient. Finalement, la production d'entropie reviendrait à son équilibre initial. Toutefois, la cellule est un système ouvert loin de l'équilibre, ce qui en fait par la même

occasion un système plus complexe, qui ne peut être décrit par des lois linéaires et qui peut passer par différents minima de production d'entropie (Toussaint, O. *et al.*, 1992).

3.2) Effet des stress: point de vue de la thermodynamique des systèmes ouverts

Une modification des conditions environnementales perturbe directement le système cellulaire. Ses principales voies métaboliques perdent leur caractère optimisé, donnant lieu à une baisse de leur activité par unité de substrat disponible et par unité de temps, donc à une baisse de leur production d'entropie. Les cellules vont réagir face à cette perte d'optimisation.

Les critères de stabilité des systèmes ouverts soumis à des fluctuations entrent alors en ligne de compte. En bref, selon le niveau des dommages générés par la perturbation et selon l'efficacité des mécanismes de défense, le système cellulaire sera capable ou non de revenir à son niveau de départ. S'il en est incapable, soit il va disparaître (mort cellulaire), soit le système va se réorganiser et réoptimiser son fonctionnement malgré un niveau d'erreurs plus élevé. Cela explique que lors d'une perturbation, la cellule va consommer plus d'énergie pour contrecarrer les effets du stress et tenter de revenir à son état de départ. On comprend mieux dès lors l'effet protecteur du D-glucose, important pourvoyeur d'énergie (Toussaint, O. *et al.*, 1994).

Un lien direct peut être établi entre la thermodynamique des systèmes ouverts et les différents morphotypes cellulaires. En effet, la thermodynamique suppose que chacune des différentes morphologies cellulaires correspond à un niveau de production d'entropie mais aussi énergétique.

L'approche thermodynamique des systèmes ouverts comme nous l'avons décrite peut aussi expliquer l'évolution des cellules au cours du temps et en particulier certains aspects du vieillissement des cellules comme le vieillissement accéléré sous l'effet de stress sublétaux.

3.3) Effet des stress sublétaux sur le vieillissement cellulaire

Au sein de l'organisme, la cellule se trouve dans un milieu relativement constant. Il n'en reste pas moins vrai qu'il existe toute une série de modifications de son environnement auxquelles les

cellules réagissent plus ou moins efficacement en activant ou inhibant certaines voies métaboliques. La machinerie cellulaire est capable de réagir à la plupart des stress potentiellement rencontrés: les stress osmotiques, radicalaires, mécaniques, etc.

In vitro, il est très facile de stresser des cellules. Il suffit par exemple de changer la température (cold et heat stress), la pression partielle en O_2 ou encore la composition du milieu pour les perturber. La question principale posée par ce travail est de savoir si ces stress peuvent influencer le processus de vieillissement. Les stress radicalaires réalisés *in vitro* sur les fibroblastes de poumon foetaux (WI-38), utilisés dans ce travail sont le plus souvent réalisés au moyen de deux molécules: le t-BHP (tert-butyl hydroperoxyde) et l' H_2O_2 (peroxyde d'hydrogène). Ces molécules génèrent des radicaux libres à l'intérieur de la cellule. Les radicaux libres sont des molécules possédant un électron non-apparié et sont de ce fait très réactionnels. Ils peuvent en effet modifier l'ADN au niveau des bases et des sucres provoquant alors des mutations ponctuelles, des délétions ou des cassures simples ou double brins. Face aux radicaux libres, la cellule possède des systèmes de défense, soit enzymatiques (catalase, superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, etc) soit chimiques (glutathion, vitamines E et C). Ces systèmes peuvent être dépassés lors de stress radicalaires perturbant alors la stabilité originelle de la cellule. Les questions étant alors de savoir, premièrement, si ces systèmes sont irréversiblement dépassés ou non, permettant ou non la survie cellulaire. En effet, des stress trop intenses dépasseront la tolérance cellulaire et provoqueront la mort de la cellule. Deuxièmement, les dommages ont-ils la possibilité de se propager de manière irréversible à certains composants cellulaires avant que la cellule ne détruise ces radicaux libres, ce qui pourrait provoquer un vieillissement accéléré mais aussi enclencher un programme d'apoptose.

En réalisant des stress oxydatifs sublétaux, c'est-à-dire ne provoquant qu'une faible mortalité cellulaire, au moyen de t-BHP ou d' H_2O_2 , on permet aux cellules de rester encore longtemps viables. Dans ces circonstances, on a pu montrer que ces cellules subissent un vieillissement accéléré.

Dans ce cas, on observe comme dans la sénescence répllicative mais tout en restant dans la même génération cellulaire (même CPD) les mêmes changements. On constate une augmentation importante des morphotypes postmitotiques et dégénératifs, mais aussi une augmentation du pourcentage de cellules marquées par l'activité SA- β -gal, une surexpression de p21 (waf-1) et une hypophosphorylation de pRb montrant une relation directe entre

ces deux marqueurs du vieillissement. On remarque aussi une diminution de la synthèse protéique mesurée par incorporation de [^{35}S]-méthionine (Bayreuther, K. *et al.*, 1988b).

On peut voir également une diminution de la prolifération cellulaire mesurable par une diminution drastique de l'incorporation de [^3H] thymidine dans l'ADN (Mocali, A. *et al.*, 1995).

Lors de stress sous une atmosphère contenant 40% d'oxygène il a aussi été constaté une diminution de la taille des télomères, une augmentation de la production de lipofuscine et un arrêt de la prolifération en phase G1 du cycle cellulaire. Cette diminution de la longueur des télomères est de l'ordre de 500 bp par doublement de la population lors des cultures sous hyperoxie. Alors que, pour les fibroblastes cultivés en normoxie, le raccourcissement moyen par doublement de population varie de 50 à 100 bp suivant la souche.

4) Projet de recherche

Le vieillissement cellulaire s'accompagne de nombreuses modifications moléculaires.

L'établissement de cultures cellulaires sériées de cellules humaines normales et prolifératives, constitue un modèle *in vitro* d'étude du vieillissement dont la validité n'est plus contestée. En effet, tant au niveau des biopsies que des cellules en culture, des biomarqueurs semblables du vieillissement sont observés tels que l'activité SA- β -gal, le raccourcissement des télomères ou encore l'arrêt irréversible de la prolifération cellulaire.

L'originalité de ce travail réside dans le fait que nous étudierons les effets à long terme des stress sublétaux, plusieurs jours au moins après les stress, sur le comportement cellulaire et en particulier sur le vieillissement cellulaire.

Précédemment, il a été montré au laboratoire à travers divers critères, que les stress sublétaux appliqués à des cultures de fibroblastes humains, jeunes WI-38 induisent un vieillissement prématuré de celles-ci.

Des biomarqueurs du vieillissement normal, d'ordre biochimique, histochimique, et morphologique se retrouvent dans les fibroblastes humains en culture soumis à des stress sublétaux.

Dans ce cadre nous examinerons plus particulièrement deux types de modifications: l'apparition d'une délétion de 4977 bp dans le génome mitochondrial et la variation d'expression génique au cours du vieillissement normal ou accéléré sous l'effet de stress oxydatifs.

De nombreuses recherches décrivent la corrélation entre la délétion de 4977 bp dans le génome mitochondrial et le vieillissement. Cependant, ces études ont été menées sur des biopsies qu'elles soient d'origine humaine ou non. Cela n'avait jamais été réalisé à partir d'ADN mitochondrial provenant de cultures de cellules humaines. De plus, les travaux réalisés sur du matériel humain sont non quantitatifs ou semi-quantitatifs. Dans le cadre de ce travail, nous avons étudié non seulement l'apparition de la délétion au cours du vieillissement *in vitro* normal et accéléré par des stress radicalaires au t-BHP mais aussi tenté de quantifier le pourcentage de génomes délétés par rapport au nombre total de molécules d'ADN mitochondrial.

En outre, on comparera le niveau de délétion dans le vieillissement normal ou accéléré sous l'effet de stress sublétaux au t-BHP.

Enfin, une méthode de PCR quantitative utilisant un standard interne sera mise au point.

En ce qui concerne la variation d'expression de gènes avec le vieillissement, nous avons brièvement décrit dans l'introduction les travaux de Gonos sur les lignées tsa conditionnellement immortalisées. Ces travaux ont permis de mettre en évidence des gènes dont l'expression varie lors de la perte du phénotype immortel suite à l'inactivation de l'antigène T.

Dans ce travail, nous allons tenter de déterminer le taux de transcription de ces gènes lors du vieillissement normal ou provoqué sous l'effet de stress au H_2O_2 .

Nous analyserons le niveau de transcription de gènes codant pour des protéines de la matrice extracellulaire (fibronectine, ostéonectine, $\alpha 1$ (I) -procollagène) d'un gène impliqué dans le métabolisme énergétique (sous-unité 4 de la cytochrome oxydase), ainsi que des gènes codant pour l'apolipoprotéine J, SM 22 (Smooth Muscle 22), la sous-unité α des GTP binding protein et SS9 une séquence codante non caractérisée.

Ces résultats permettront de savoir si le vieillissement accéléré par les stress résulte en des changements de l'expression similaires à ceux observés lors du vieillissement normal. On espère ainsi mieux comprendre le mécanisme moléculaire du vieillissement accéléré par les stress.

MATERIELS ET METHODES

1) Culture et stress successifs des fibroblastes WI-38 et IMR-90

1.1) Les cellules

L'ensemble des travaux présentés a été réalisé sur des fibroblastes humains de poumon foetal, souche WI-38, prélevés en 1961 par Hayflick et Moorehead et conservés depuis à "l'American Type Collection", tout comme les fibroblastes IMR-90.

Ces cellules sont mises en culture dans des boîtes de 75 cm² (Nunc, Denmark) dans du milieu BME (Basal Medium Eagle, Flow Laboratories, U.K.) auquel est ajouté 10% de sérum de veau foetal. Ce sérum contient de nombreux facteurs de croissance nécessaires à la survie et à la division cellulaire. Ce milieu est conservé à -20°C mais est préchauffé à 37°C avant son utilisation.

1.2) Condition stérile

Les cultures cellulaires nécessitent la plus grande stérilité possible. L'ensemble du matériel utilisé est stérilisé par un passage de 6 heures dans un stérilisateur à 180 °C. Les milieux sont stérilisés par filtration sur filtre de 0,2 µm (Sartorius, Allemagne).

1.3) Trypsinisation

Pour récupérer les cellules, il est nécessaire de les trypsiniser. Cette étape permet de les détacher du fond de leur boîte de culture. La trypsine utilisée est en fait une solution stérile composée de trypsine 0,25% diluée dans une solution A de Gibco (Grande-Bretagne): 0,4 g/l de KCl; 2,2 g/l de NaHCO₃ (Merck, Allemagne); 6,8 g/l de NaCl (Merck, Allemagne); 1 g/l de glucose (Merck, Allemagne) et 0,005 g/l de rouge de phénol.

En pratique, les boîtes de culture sont rincées avec du milieu sans sérum après avoir été totalement décantées. Ces lavages éliminent toute trace du sérum pouvant inhiber l'action de la trypsine. Par boîte, de 75 cm² on met 2 ml de solution de trypsine pendant environ 1 minute. On décante ensuite sans enlever totalement le fond de solution restant. On réincube pendant 10 minutes.

Suite à ces opérations, les cellules sont détachées mais, puisque la trypsine est toujours active, on l'inhibe avec un peu de BME + 10% de sérum.

Les cellules sont ensuite agitées fortement avec une pipette pasteur en projetant le milieu BME contre la paroi de la boîte pour décoller les quelques cellules résistantes mais aussi rompre les amas de cellules.

1.4) Conservation des cellules

Nous disposons d'un stock de cellules congelées à -196°C dans de l'azote liquide ce qui nous permet d'avoir des cellules à différents passages en culture.

Congélation:

Méthode:

- Détacher les cellules par trypsinisation de la boîte de culture (point 1-3).
- Centrifuger 10 minutes à 1000 RPM (centrifugeuse Hettich Universal, Allemagne) les cellules reprises dans du BME + 10% de sérum.
- Eliminer le surnageant.
- Resuspendre les cellules dans 0,4 ml de BME additionné de 10 % de diméthyl sulfoxyde (DMSO, Merck, Allemagne) comme agent cryoprotecteur.
- Déposer les cellules dans un cryotube (Nunc, Denmark).

La congélation des cellules est réalisée grâce à un appareil (PTLD 75, L'Air Liquide, Belgique) qui réalise un abaissement en deux phases de la température. Celle-ci est d'abord abaissée jusqu'à -40°C à raison de 1°C par minute puis très rapidement jusqu'à -100°C . Le cryotube est ensuite stocké à -196°C .

Décongélation:

Méthode:

- Plonger le cryotube dès sa sortie de l'azote liquide dans un bain à 40°C.
- Centrifuger 10 minutes à 1000 RPM (centrifugeuse Hettich Universal) et éliminer le surnageant.
- Resuspendre délicatement les cellules dans 1 ml de BME + 10% de sérum.
- Repiquer les cellules dans une boîte de culture qui reçoit 15 ml de BME + 10% de sérum.

1.5) Repiquage des cellules

Lorsque la monocouche cellulaire couvre l'entièreté de la surface de culture, les cellules sont dites confluentes et sont repiquées. Cette opération consiste à répartir les cellules d'une boîte de culture dans deux ou quatre boîtes. Les différents repiquages permettent aux cellules de passer d'un niveau de doublement de population à l'autre.

Méthode:

- Préchauffer à 37°C dans une étuve du milieu de rinçage (BME seul), du milieu de culture (BME + 10% de sérum) et de la solution de trypsinisation (point 1-3).
- Décanter la boîte et rincer avec 10 ml de milieu de rinçage, pour une boîte de 75 cm², pendant environ 1 minute sous agitation douce.
- Trypsiniser comme au point 1-3.
- Ensuite 20 ou 50 ml de BME + 10% de sérum seront ajoutés suivant que l'on réalise un repiquage en 2 ou en 4 boîtes. Le milieu contenu dans la boîte trypsinisée est finalement homogénéisé et réparti également entre les nouvelles boîtes.

1.6) Stress au t-BHP ou H₂O₂

Les stress sublétaux sous tert-butylhydroperoxyde (t-BHP: Merck, Allemagne) ou sous H₂O₂ (Merck, Allemagne) sont utilisés pour accélérer le vieillissement des cultures de fibroblastes.

Nous réalisons dans ce travail 5 stress successifs de 1 heure au t-BHP séparés de 24 heures ou un stress unique sous H₂O₂ à une concentration de 450 µM. Durant ces 24 heures, les cellules sont maintenues dans du BME + 10% de sérum.

Méthode:

- Diluer le t-BHP dans de l'eau désionisée. Le t-BHP est une molécule instable, les préparations doivent être en conséquence fraîches. De plus, le t-BHP à forte concentration est peu soluble dans le milieu de culture. On réalise donc la première dilution à 10⁻² M dans de l'eau en mélangeant fortement.
- Stériliser la solution en la passant sur filtre de 0,2 µm (Sartorius, Allemagne).
- Diluer ensuite pour obtenir la bonne concentration dans du milieu de culture avec sérum.
- Remplacer le milieu contenu dans la boîte de culture par celui de stress (15 ml par boîte de 75 cm²).
- Incuber 1 heure à 37°C dans une étuve à 5% de CO₂, le bouchon de la boîte de culture déserré.
- Décanner complètement le milieu de stress.
- Rincer les cellules avec 10 ml de milieu de rinçage (BME sans sérum). Il faut mélanger très doucement lors de cette étape car les cellules fragilisées par le stress peuvent se détacher.
- Remettre 15 ml de BME + 10% sérum.

N.B.:

En parallèle, pour tenir compte de l'effet généré par les changements de milieu seul et sans stress, il faut une boîte

PBS (Phosphate Buffer Saline)	Tampon phosphate 10 mM additionné de NaCl 0,9%, pH 7,4
Solution de fixation	Solution aqueuse de dilué dans du PBS -formaldehyde 2% (Belgolabo, Belgique) -glutaraldéhyde 0,2% (Fluka, Pays-Bas)
Solution de coloration	Pour 20 ml: -4 ml de tampon 0,2M acide citrique/Na (SDS, France) tampon phosphate pH 6 -1 ml d'une solution 0,1M de ferrocyanure de K (K ₃ FeCN ₆ : Merck, Darmstad, Allemagne) -1 ml d'une solution 0,1M de ferricyanure de K (K ₄ FeCN ₆ : Merck, Darmstad, Allemagne) -0,6 ml d'une solution de NaCl 5 M -40 µl d'une solution 1 M de MgCl ₂ (Merck, Darmstadt, Allemagne) -12,36 ml d'eau désionisée -1 ml de solution de X-gal
Solution de X-gal	20 mg/ml de 5-bromo-4-Chloro-3-indolyl β-D-galactopyranoside (X-gal: Promega) dilué dans du diméthylformanide (DMF: Sigma, USA). Le X-gal est conservé sous forme de solution dans du DMF à -20°C et n'est ajouté dans la solution de coloration qu'avant usage

Tableau II-1: réactifs nécessaires à la visualisation de l'activité SAβ-gal

contrôle où l'on change le milieu en même temps que les cellules stressées.

2) Détection de l'activité SA- β galactosidase

L'activité β -galactosidase associée à la sénescence et détectée à pH 6 (SA β -gal) est un biomarqueur associé à la sénescence des cellules *in vitro* mais aussi *in vivo*. Cette activité spécifique n'est détectable qu'à pH 6 par une coloration spécifique. Elle diffère donc de l'activité β -gal des lysosomes qui est optimale à pH 4 et de celle des bactéries à pH 7.

Méthode:

- Repiquer les cellules à faible densité dans des boîtes de pétri de 35 mm de diamètre (Sarsted, Allemagne) contenant 2 ml de milieu de culture.
- Laisser 24 heures dans une étuve à 5% de CO₂ et 37°C.
- Eliminer le milieu de culture puis les cellules et les laver deux fois au PBS (Phosphate Buffer Saline: tableau II-1 verso page II-5).
- Fixer ensuite les cellules 5 minutes dans la solution de fixation.
- Les cellules sont ensuite rincées de nouveau 2 fois au PBS
- Colorer pour l'activité β -gal (tableau II-1, verso page II-5).
- Incuber les cellules 20 heures à 37°C en absence de CO₂.
- Retirer la solution de coloration.
- Laver les cellules 2 fois au PBS puis au méthanol (SDS, France).

Une fois les boîtes complètement sèches, on peut déterminer les proportions de cellules sénescents (colorées) et de cellules encore jeunes (non colorées)

3) Extraction d'ADN mitochondrial

Cette technique nous a été aimablement communiquée par le Dr. Nicole Filser de l'Institut Federal Suisse de Technologie.

L'ADN mitochondrial étant une molécule circulaire, le protocole utilisé pour l'extraire de cellules en culture est très proche de celui utilisé pour l'extraction d'ADN plasmidique de bactéries.

3.1) Récupération des cellules

La première étape consiste à récupérer les cellules de la boîte de culture.

Méthode:

- Enlever complètement le milieu de culture (BME + sérum).
- Rincer la boîte avec du milieu sans sérum (BME).
- Ajouter 2 ml de solution de trypsinisation (point 1.3) préchauffée à 37°C par surface de culture de 75 cm².
- Incuber 1 minute à 37°C.
- Enlever l'excédent de trypsine sans la décanter complètement.
- Incuber 10 minutes à 37°C.
- Verser dans la boîte 5 ml de milieu de culture avec sérum par surface de 75 cm². Le but est d'inhiber la trypsine qui peut abîmer les cellules si on la laisse agir trop longtemps.
- Détacher les quelques cellules encore accrochées en projetant le milieu de culture sur la paroi grâce à une pipette pasteur.
- Les cellules étant maintenant en suspension dans le milieu de culture, récolter le milieu.

3.2) Lavage des cellules

Une fois les cellules récoltées, il faut éliminer le milieu de culture.

Méthode:

- Centrifuger le milieu de culture contenant les cellules pendant 10 minutes à 1000 RPM (centrifugeuse Hettich Universal, Allemagne).
- Éliminer le surnageant et resuspendre dans du Tris-EDTA (10mM/1mM, pH 8).
- Centrifuger 10 minutes à 1000 RPM comme ci-dessus.
- Éliminer le surnageant.
- Recommencer ces 3 dernières étapes 2 fois puis resuspendre les cellules dans 300 µl de Tris EDTA.

3.3) Extraction de l'ADN

- Ajouter au culot cellulaire 300 µl de solution 0,2M NaOH/1% SDS pour lyser les cellules.
 - Mélanger très délicatement le tube de type eppendorf pendant 6 minutes et pas plus.
- NB: Ne pas mélanger avec une pipette.
- Ajouter 300 µl d'acétate de potassium 3 M pH 5,5 (Vel, Belgique).
 - Inverser quelquefois le tube délicatement.
 - Garder 10 minutes sur glace.
 - Centrifuger 15 minutes à 13000 RPM, 4°C (Biofuge Sartorius, Heraeus Instrument, Belgique).
 - Récupérer le surnageant et y ajouter 0,8 volume d'isopropanol (Merck, Allemagne).

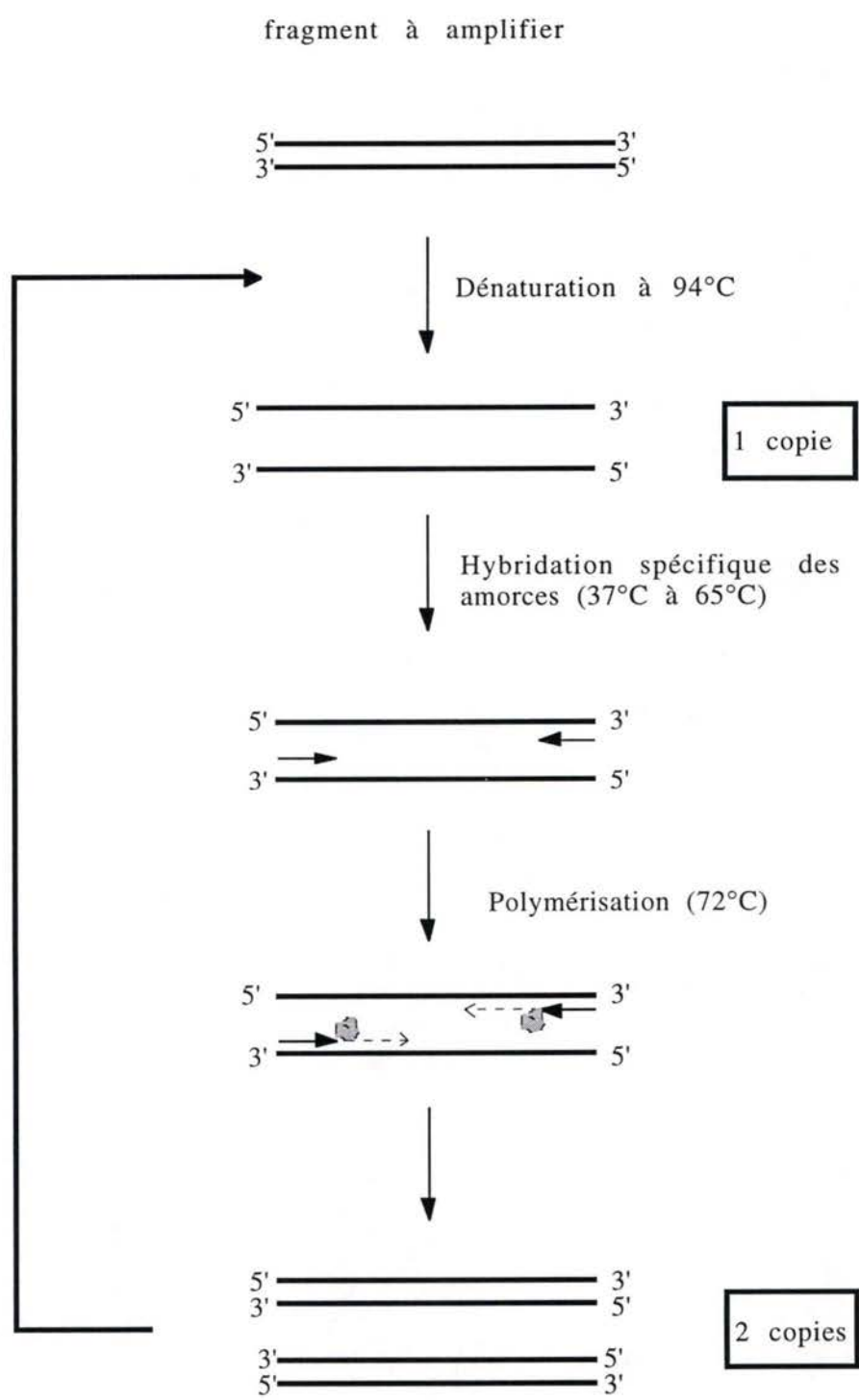


Figure II-1: Principe de la PCR.
Ces étapes forment un cycle qui peut être répété plusieurs fois.

→ : amorce

⬢ : polymérase

- Homogénéiser doucement.
- Incuber 5 minutes à température ambiante.
- Centrifuger 30 minutes dans les mêmes conditions que ci-dessus.
- Eliminer le surnageant.
- Laver avec 200 µl d'éthanol 70% (Merck, Allemagne).
- Eliminer le surnageant et sécher sous vide.
- Resuspendre dans 20µl d'eau désionisée autoclavée.

4) PCR (réaction en chaîne par polymérase)

La PCR (polymerase chain reaction) est une technique *in vitro* qui permet l'amplification spécifique d'une région comprise entre deux sites de séquences connues.

L'ADN est une double hélice comprenant deux brins antiparallèles et reliés ensemble par des ponts hydrogènes.

L'amplification d'une séquence d'ADN est possible grâce à l'utilisation d'amorces. Ce sont de courtes séquences simple brin qui sont complémentaires des extrémités de la séquence à amplifier. Les amorces se fixent chacune sur un seul des brins de l'hélice d'ADN lorsque celle-ci est dénaturée (figure II-1, verso page II-8).

Les amorces sont prolongées sous forme monobrin par une polymérase d'ADN à partir de la matrice dénaturée et ceci en présence de déoxynucléosides triphosphates (dNTP). On obtient alors un nouveau brin anticomplémentaire de la matrice.

Ces étapes peuvent être répétées pour amplifier un grand nombre de fois la matrice choisie. Dans ce cas, les brins nouvellement amplifiés, dans la réaction précédente, servent de matrice pour celle-ci.

Il y a trois grandes étapes dans la PCR, il s'agit de la dénaturation, l'hybridation et l'élongation. La dénaturation sert à séparer les deux brins de la double hélice d'ADN (elle est généralement réalisée à 94°C). Elle permet alors l'hybridation, stade pendant lequel les amorces se fixent spécifiquement par complémentarité sur les monobrins. Là aussi une température précise est utilisée. Elle dépend du pourcentage en G-C et A-T de l'amorce (la température ainsi que la durée détermine la spécificité de l'amplification, une trop faible température ou une durée trop longue diminuent la spécificité). La dernière étape

est l'élongation. Il s'agit là de la période pendant laquelle la polymérase construit la copie de la matrice initiale nucléotide après nucléotide. Cette étape se déroule à 72°C. Sa durée est adaptée en fonction de la taille de la séquence à amplifier par rapport à la capacité d'incorporation de dNTP de la polymérase.

A la fin de l'ensemble des cycles d'amplifications, le temps d'élongation du dernier est fortement prolongé pour permettre à la polymérase de compléter la synthèse de l'ensemble des brins. C'est pour cela que chaque ensemble de cycles se termine par une élongation de 10 minutes à 72°C.

4.1) ADN polymérase

Selon la taille du fragment à amplifier, on utilise des enzymes différents.

Pour les fragments supérieurs à 5 kb, nous avons utilisé la Expand™ High Fidelity PCR System (Boehringer/Mannheim, Allemagne). Il s'agit d'un mélange de Taq et de polymérase à ADN Pwo. Pour les plus petites tailles, l'AmpliTaq Gold (Perkin Elmer, USA) a été utilisée.

L'ensemble des réactions se déroule avec des concentrations de tampons nécessaires, définies par la firme, à l'activité de l'enzyme.

4.2) Choix des amorces

Le choix des amorces est une étape cruciale pour le bon déroulement de la PCR.

Pour éviter toute complication, on doit respecter quelques règles élémentaires.

Il faut en effet pour avoir une amplification unique utiliser des amorces spécifiques de la séquence voulue. C'est pourquoi, un minimum de 20 bases est nécessaire.

On vérifie aussi grâce au logiciel de simulation, Oligo4, l'éventuelle formation de dimères entre ces amorces mais aussi que celles-ci ne présentent pas de région anticcomplémentaire en leur sein ce qui provoquerait la formation de boucles (loop, hairpins). Ces boucles et dimères diminuent fortement l'efficiencia de la PCR.

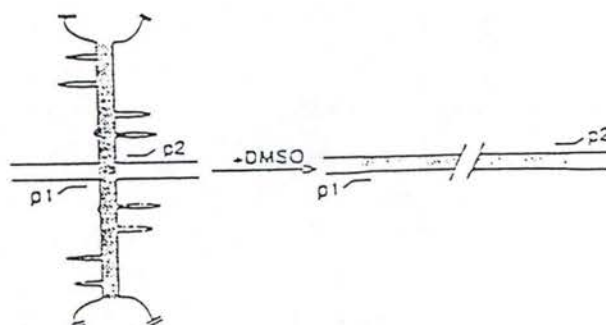


Figure II-2: Le DMSO déplie les structures secondaires de l'ADN (Shen, W.H.andHohn, B., 1992).

4.3) Calcul de la température d'hybridation

Le calcul théorique permet d'approcher la température optimale d'hybridation à laquelle le produit PCR est spécifique mais aussi le rendement maximal.

On utilise habituellement la formule:

$$T_m (\text{hybridation}) = (2AT + 4GC) - 4^{\circ}\text{C}$$

Cette formule tient compte de la différence de la force de liaison entre A et T par rapport à G et C ainsi que de leur nombre.

Il est toutefois parfois nécessaire de l'ajuster expérimentalement.

4.4) Utilisation du DMSO

Le DMSO (diméthyl sulfoxyde) est une molécule capable de réduire les hybridations non spécifiques et de dénaturer les structures secondaires de l'ADN (figure II-2, verso page II-10)

Le mode d'action du DMSO est encore inconnu mais, à faible concentration (0,9 à 2%), il améliore fortement l'efficacité de l'hybridation des amorces mais aussi dénature les structures secondaires de l'ADN.

4.5) Conditions de PCR utilisées

L'ensemble des conditions utilisées lors des PCR est repris dans le tableau II-2 (ci-dessous)

séquence à amplifier	fragment mitochondrial jamais délété (H1)	résultant de la délétion (H2del)	fragment sans délétion (H2)
taille (bp)	533 bp	524 bp	5501 bp
enzyme	AmpliTaq	AmpliTaq	Expand
mélange PCR	10 µl buffer 10x 8 µl MgCl ₂ dNTP 200µM L1 H1 0,4µM poly.:2,5 U matrice:0,15à1 µg	idem (avec ou sans 1% de DMSO)	5 µl buffer 10 x 200 µM dNTP L2 H2 0,4µM poly.:2,6 U matrice:0,1à 0,75 µg
nombre de cycles	40	30 à 40	30

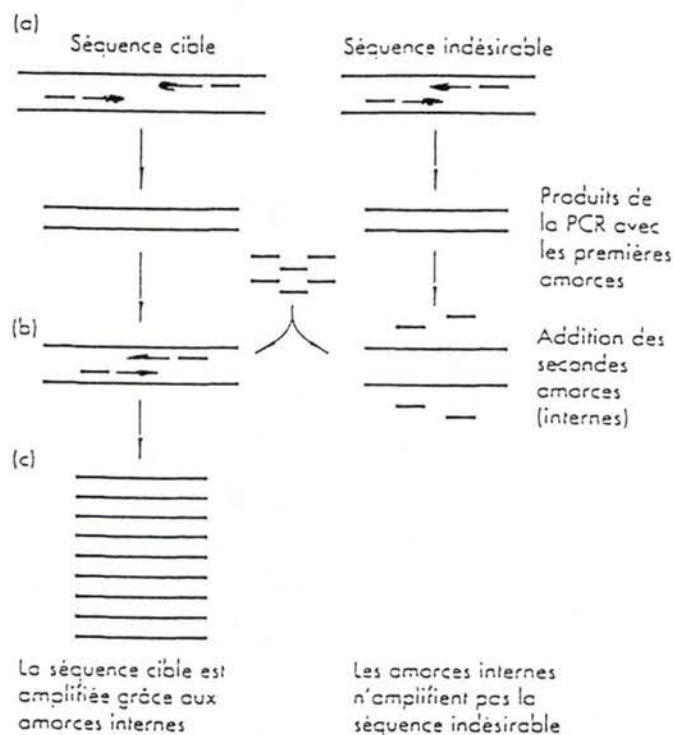


Figure II-3: L'utilisation d'amorces "emboîtées" permet d'augmenter la sensibilité de la PCR et d'éviter l'amplification de séquences indésirables. La nested PCR utilise 2 paires d'amorces, une paire dite externe (a) pour une première amplification et une paire d'amorces internes (b) spécifiques et internes au fragment cible de la première paire. Par ce procédé les fragments d'ADN indésirables amplifiés lors de la première PCR qui ne possèdent pas de séquences correspondantes aux secondes amorces ne seront pas amplifiés lors de la seconde PCR alors que la séquence cible le sera. Les flèches horizontales indiquent le sens de polymérisation.

volume final (μ l)	100	100	50
activation	94°C 10 minutes	94°C 10 minutes	94°C 2 minutes
température dénaturation hybridation élongation	94°C 30 secondes 56°C 40 secondes 72°C 1 minute	idem	94°C 15 secondes 56°C 30 secondes 72°C 45 secondes Après 10 cycles, le temps d'élongation doit être prolongé de 5 secondes à chaque cycle
amorces (séquences en annexe)	L1 H1	L2 H2	L2 H2

Tableau II-2: Récapitulatif des conditions de PCR "simplex" utilisées.

4.6) Nested PCR

La nested PCR utilise des amorces internes à la séquence à amplifier (figure II-3). Le fragment produit lors de la simple PCR sert ici de matrice pour l'amplification par la nested PCR (tableau II-3).

taille (bp)	404
enzyme	AmpliTaq
mélange PCR	10 μ l buffer 10x 8 μ l $MgCl_2$ 1 μ l produit simple PCR dNTP 200 μ M L3 H3 0,4 μ M 2,5 U poly. matrice: 500 ng
nombre de cycles	40
volume final (μl)	100
activation	94°C 10 minutes
température	94°C 30 secondes 56°C 40 secondes 72°C 45 secondes
amorces (séquences en annexe)	L3 H3

Tableau II-3: Ensemble des conditions de nested PCR

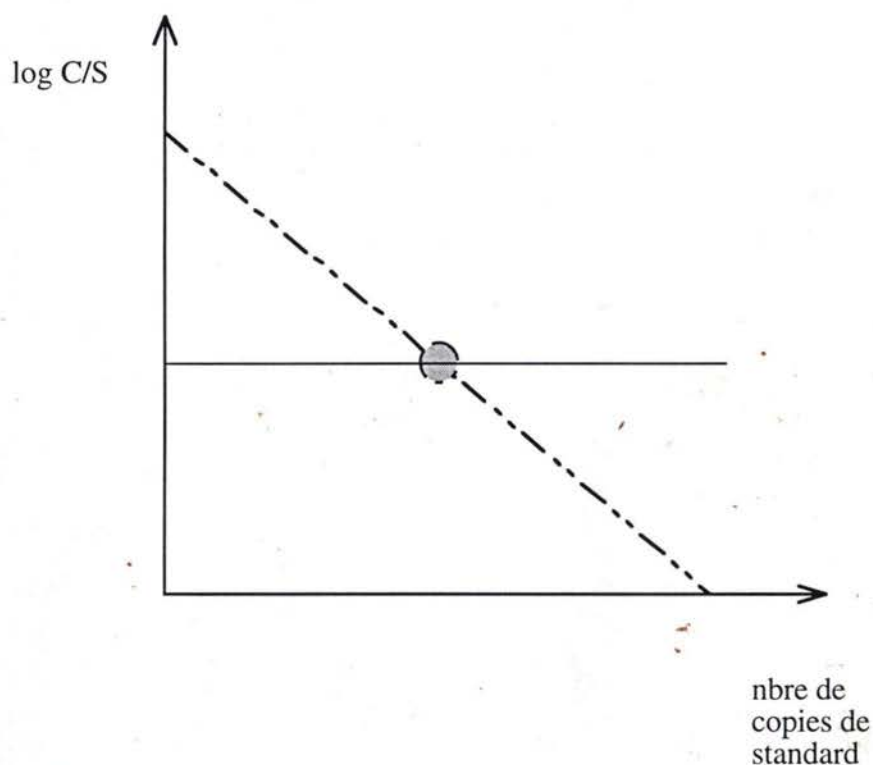


Figure II-4: Compétition entre le mimique et le fragment à doser. Le trait pointillé représente le logarithme du rapport du signal du fragment à doser (C) sur le signal du standard (S) et le continu le signal du fragment à doser dont la quantité reste constante (il représente le 100%). Lors des dosages, seule la quantité de standard varie. Dans la partie gauche du graphe le fragment sauvage est en large excès par rapport au mimique (standard). Dès lors, l'amplification du standard est anecdotique. A droite, c'est l'inverse. Au centre il y a équivalence de signal nous indiquant que l'amplification des deux séquences est équivalente (rond grisé). On connaît alors grâce au mimique le nombre de copies du fragment à doser.

La spécificité et la sensibilité sont fortement augmentées par cette technique. On élimine en effet de nombreuses amplifications non spécifiques grâce à la non-complémentarité de ces amplicons avec les amorces internes. Toutefois, suite au plus grand nombre de manipulations, le risque de contamination est fortement élevé et nécessite de manipuler avec attention.

4.7) PCR compétitive

La PCR compétitive est une méthode de PCR quantitative. Cette technique a été utilisée dans ce travail pour évaluer le nombre de copies du génome mitochondrial humain présentant la délétion commune de 4977 bp par rapport au nombre total de copies du génome mitochondrial. Cette méthode a déjà été utilisée sur l'ADN mitochondrial de rat par Filser et al. (Filser, N. *et al.*, 1997).

Cette technique a comme base la mise au point d'un standard interne (mimique), il s'agit d'un fragment d'ADN qui est amplifié en même temps et dans le même tube que la séquence du génome mitochondrial à doser.

Cette mimique est particulière. En effet, il s'agit d'un fragment d'ADN de même taille et de séquence presque identique à celle du fragment à doser mais se distinguant de celui-ci par un site de restriction.

Du fait de leur séquence très proche, l'efficacité de la PCR est identique car les amorces se fixent avec une égale affinité sur la mimique et le fragment à quantifier. On peut donc doser le fragment voulu par rapport à une quantité de standard connue. Pour ce faire, on réalise des PCR simplex contenant un nombre de copies de mimique décroissant de tube en tube, mais aussi une quantité constante de notre extrait à doser. Après, le produit d'amplification est restreint par l'endonucléase spécifique du standard interne. On obtient alors, en radioactivité ou au bromure d'éthidium, deux signaux (un pour le standard et un pour le fragment à doser) qui, lorsqu'ils sont identiques nous donnent le nombre de copies d'ADN mitochondrial présentant la délétion (figure II-4, verso page II-12).

N.B:

Une fois le standard interne produit, la PCR compétitive se réalise dans les mêmes conditions que les PCR normales (tableau II-2, page II-11)

Séquence à amplifier	Mimique H1		Mimique H2	
taille (bp)	237	302	346	197
enzyme	AmpliTaq Gold		AmpliTaq Gold	
mix PCR	10 µl buffer 10X 8 µl MgCl ₂ DNTP 200 µM amorce 20 pmole de chaque matrice: 0,1µg		10 µl buffer 10X 8 µl MgCl ₂ DNTP 200 µM amorce 20 pmole de chaque matrice: 0,1µg	
nombre de cycles	5 puis 30		5 puis 30	
vol.final(µl)	100		100	
activation	94°C 10 minutes		94°C 10 minutes	
température	on réalise d'abord 5 cycles à une température d'hybridation de 54°C correspondant à la température théorique sans le bout flottant puis 30 à la température maximale de L1 et H1 (60°C) 94°C 30 secondes 54°C ou 60°C 40 secondes 72°C 45 secondes		on réalise d'abord 5 cycles à une température d'hybridation de 54°C correspondant à la température théorique sans le bout flottant puis 30 à la température maximale de L1 et H1 (60°C) 94°C 30 secondes 54°C ou 60°C 40 secondes 72°C 45 secondes	
amorces	L1 et A2	B2 et H1	L2 et C1	C2 et H2

Tableau II-4: conditions de PCR de production des standards internes

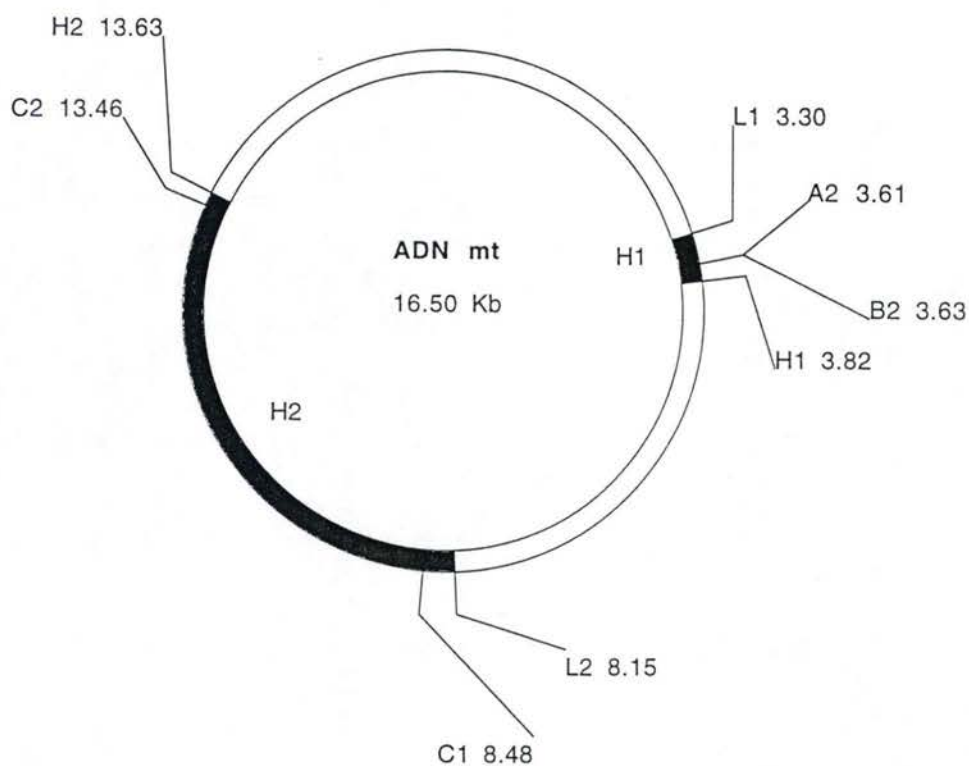


Figure II-5: Représentation schématique du génome mitochondrial. Les fragments H1 et H2 (fragment non délété) sont représentés par les zones ombrées. On y voit aussi les différentes amorces, avec le début de leur position, utilisées lors des PCR à bout flottant.

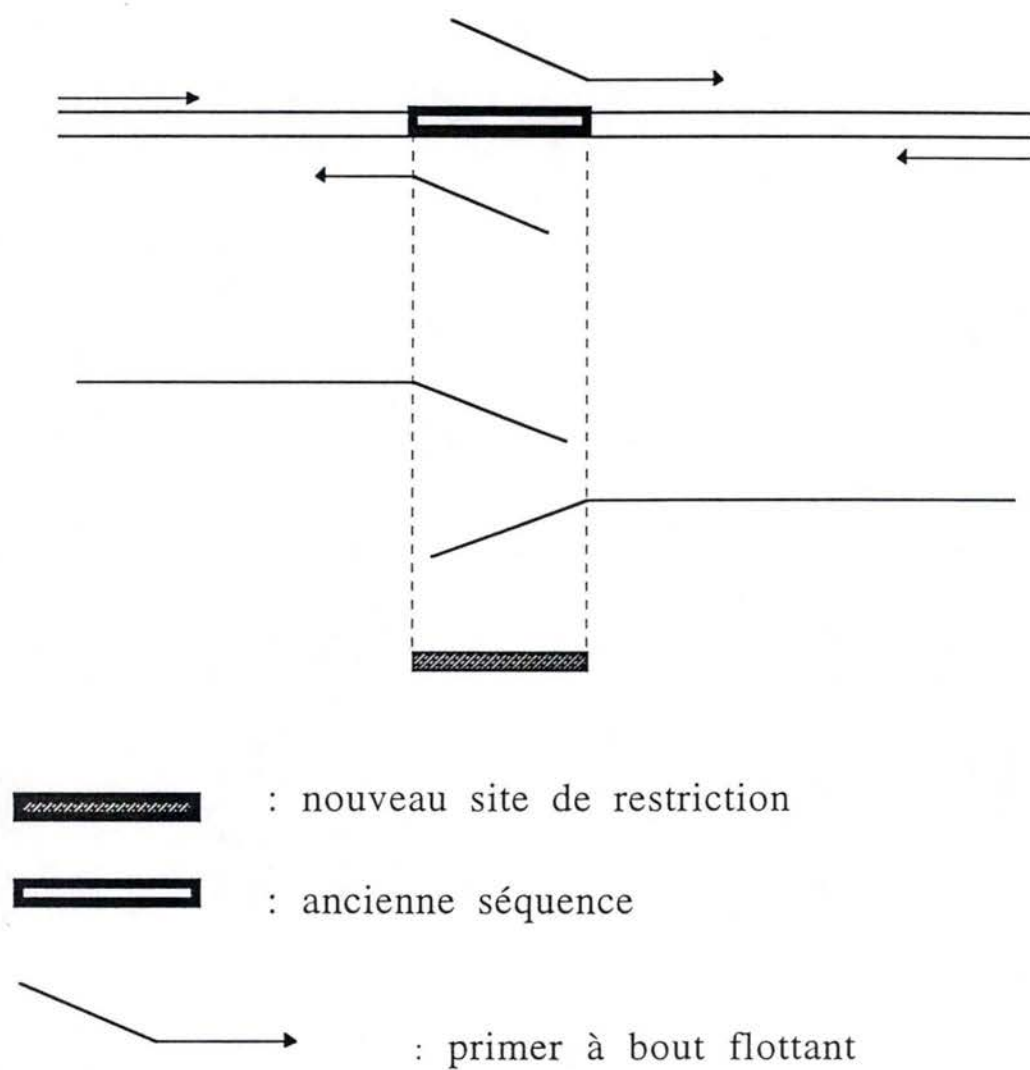


Figure II-6: Représentation schématique des PCR à bout flottant

4.8) Production de standards internes

Nous avons besoin de deux standards internes dans ce travail. L'un servant à connaître le nombre de copies du génome mitochondrial par μ l de notre extrait et un autre, nous donnant le nombre de copies d'ADN mitochondrial présentant la délétion de 4977 bp par rapport au nombre total de copies mises dans le tube PCR quantifié par PCR compétitive avec la première mimique.

Nous évaluons le nombre des copies d'ADN mitochondrial par rapport à un fragment du génome mitochondrial jamais délété et appelé H1 (figure II-5) et évaluons ensuite le nombre de fragments délétés (H2 del) par rapport au nombre total de copies d'ADN mitochondrial. H2 étant la séquence présente en absence de la délétion.

Les deux mimiques sont produites par PCR à bout flottant. Il s'agit d'une PCR utilisant une amorce externe et une interne à la séquence "sauvage" présentant une extrémité non-anticomplémentaire (figure II-6) de la séquence à amplifier. Cette extrémité contient le nouveau site de restriction choisi.

Suite à l'utilisation d'une amorce interne à bout flottant, on n'obtient qu'un morceau de la mimique désirée. Il faut donc faire de même pour l'autre morceau puis lier ceux-ci ensemble.

Une fois les deux morceaux produits, on les restreint par le nouveau site de restriction inséré, en l'occurrence Hind III. Cette restriction nous donne deux extrémités cohésives anticomplémentaires qu'on lie ensemble en même temps dans un vecteur p GEM[®]T Easy.

Méthode générale:

- Réaliser les deux PCR suivant les conditions reprises dans le tableau II-4, verso page II-13.
- Vérifier par électrophorèse sur gel d'agarose si les tailles des amplifications sont correctes.
- Purifier sur colonne le produit de PCR (protocole au point 5-4).
- Restreindre 2 heures par l'endonucléase Hind III à 37°C.
- Cloner les deux fragments dans le vecteur p GEM[®]T Easy suivant le protocole du point 5-3.
- Transformer dans des bactéries E.Coli Sure (point 5-5).

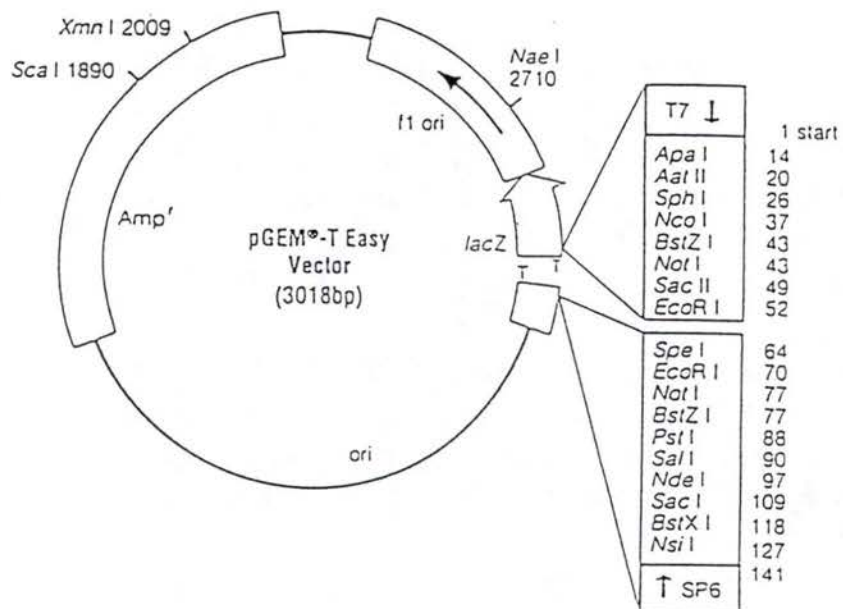


Figure II-7: Carte circulaire du vecteur pGEM®-T Easy.

5) Clonage

5.1) Souche bactérienne

Nous utilisons ici, la souche bactérienne E.Coli Sure (Stratagène, USA). Cette souche résistante à la tétracycline possède de nombreuses particularités.

Elle est partiellement délétée au niveau de l'opéron lactose en Lac Z α et elle possède dans son génome les séquences de Rec B et Rec J donnant un taux de recombinaison très faible.

Cette souche est surtout utilisée pour cloner des fragments d'ADN à forte tendance recombinatoire.

5.2) Plasmide bactérien

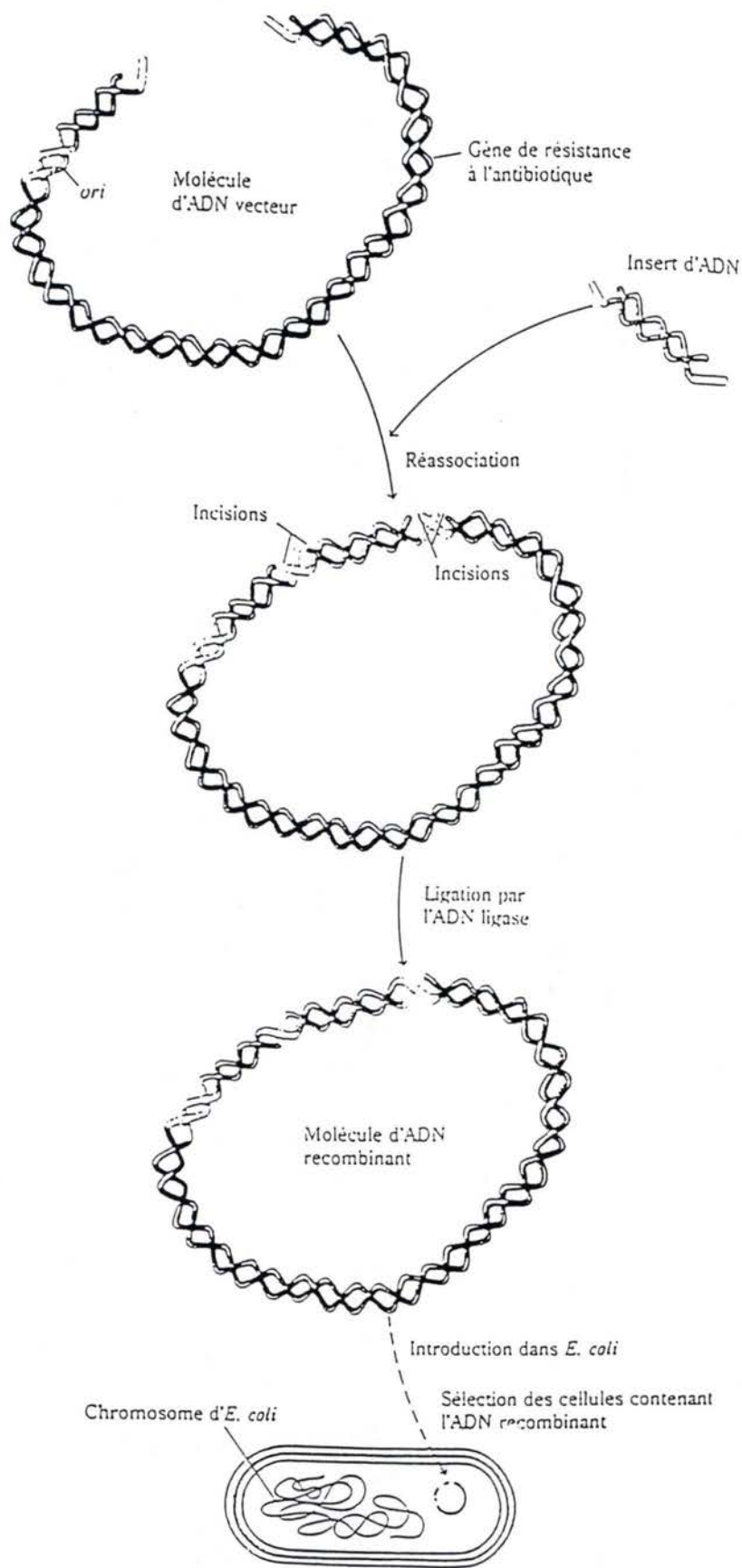
Le vecteur p GEM[®]T Easy est un système très pratique pour le clonage de produits de PCR. Ce vecteur plasmidique est préparé à partir du vecteur p GEM[®]T Easy (Promega, USA) linéarisé avec l'endonucléase Eco RV. Suite à cette linéarisation, un T terminal est ajouté aux extrémités 3' franches.

Ces T en 3' augmentent fortement l'efficacité de la ligation dans le plasmide en prévenant la recircularisation du vecteur sur lui-même et en fournissant des extrémités compatibles avec les produits PCR possédant des extrémités 5' avec en saillie un A.

Le vecteur p GEM[®]T Easy porte un gène de résistance à l'ampicilline, une origine de réplication procaryote, mais aussi un site multiple de clonage présent dans l'élément Lac Z α utilisé pour effectuer la sélection blanc-bleu (figure II-7, verso page II-14). Le MCS (site multiple de clonage) est flanqué par les séquences promotrices T7 et SP6. Ce vecteur contient aussi de nombreux sites de restriction permettant la réalisation de profils de restriction.

5.3) Ligation dans le vecteur T

La ligation dans un vecteur T est utilisée pour cloner des amplicons obtenus avec la Taq polymérase. L'activité extendase de la Taq favorise l'ajout d'une adénine supplémentaire en 3' des amplicons; ces derniers peuvent donc être clonés dans un vecteur possédant en 5' une thymine en extension (Figure II-8, dos page II-15). Ce type de ligation augmente nettement l'efficacité des ligations par rapport à



(Biochimie, Rawn, 1990)

Figure II-8: Le vecteur p GEM[®]T Easy possède en 5' une extension sous la forme d'une thymidine (symbolisée par un prolongement clair). Cette particularité permet à l'insert, possédant aux extrémités 3' une adénine (extension claire dans la figure), de s'associer au vecteur T. On soude ensemble ces deux molécules grâce à une ADN ligase. Le plasmide formé est ensuite introduit dans une bactérie.

celles obtenues avec des bouts francs. De tels vecteurs sont appelés vecteurs « T ».

Pour lier de manière covalente deux fragments d'ADN, on utilise l'enzyme ADN ligase du phage T4. Elle catalyse la formation de liens phosphodiester entre l'hydroxyle 3' d'une extrémité d'ADN et le phosphate 5' d'une extrémité proche. L'activité ligase de l'enzyme est conditionnée par la présence d'ATP et d'ions Mg^{++} .

Méthode:

- Prélever 2,5 µl de tampon T4 DNA ligase 10 x (Promega, USA).
- Ajouter 1 µl de vecteur p GEM®T Easy (50ng) (Promega, USA).
- Ajouter 8,5 µl de la purification de la première PCR et 8,5 µl de la seconde PCR également purifiée.
- Ajouter de l'eau désionisée pour que le volume final atteigne 25µl.
- Ajouter 2,5 µl de T4 DNA ligase (3 U/ml) (Promega, USA).
- Incuber une nuit à 8°C puis effectuer la transformation bactérienne.

5.4) Purification des produits PCR

La purification est réalisée en utilisant le système High Pure PCR Product Purification (Boehringer/Mannheim, Allemagne).

Le principe de purification est basé sur la fixation de l'ADN de manière spécifique sur une colonne contenant des fibres de silice. Il permet l'élimination des sels, des dNTP mais aussi des amorces.

Méthode:

- Ajouter 500 µl de tampon de liaison fourni dans le kit à 100 µl du produit de PCR. Ce tampon augmente l'efficacité de la fixation des fragments d'ADN sur la silice.
- Placer le mélange sur la colonne, elle même placée dans un tube collecteur.

- Centrifuger 30 secondes à 13.000 RPM (centrifugeuse Biofuge Pico, Heraeus Sepatech, Belgique).
- Eliminer l'éluat.
- Laver en ajoutant 500 µl de tampon de lavage, fourni dans le kit, sur la colonne.
- Laver une seconde fois mais cette fois-ci avec seulement 200 µl de tampon de lavage.
- Centrifuger comme précédemment.
- Placer la colonne dans un tube de type eppendorf propre.
- Eluer avec 200 µl de tampon d'élution (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM; pH 8,5)

5.5) Transformation des bactéries

Nous utilisons la méthode des chocs thermiques (Ausubel *et al.*, 1995).

Méthode:

- Dégeler sur glace un aliquot de 100 µl de bactéries E.Coli Sure.
- Ajouter 10 à 100 ng d'ADN exogène et mélanger.
- Placer sur glace 10 minutes.
- Placer 2 minutes dans un bain à 42°C.
- Ajouter 500 µl de milieu LB.
- Incuber à 37°C pendant 15 à 60 minutes.
- Etaler sur milieu solide et maintenir à 37°C pendant une nuit.

5.6) Les milieux de culture

Nous utilisons comme milieu de culture le milieu Luria Bertani

Composition :

Hydrolysate de caséine (peptone) (GIBCO, Grande-Bretagne): 1%
 NaCl (Merck, Allemagne) : 0,5%, Extraits de levure (Difco, USA) :
 0,5%

Méthode:

-Autoclaver 15 minutes à 120°C. Si on veut y ajouter un additif (antibiotique) (tableau II-5, ci-dessous) alors laisser refroidir.

-Le milieu LB liquide avec ou sans additif peut être stocké à 4°C.

Le milieu LB solide est de même composition mais additionné de 2% d'agar (Difco, USA).

-Après autoclave, laisser refroidir la solution dans un bain à 55°C.

-A cette température les additifs et l'(les) antibiotique(s) (tableau II-5, ci-dessous) peuvent être ajoutés.

-Couler ensuite rapidement sur boîte de pétri et laisser solidifier.

-Quand le milieu est bien solide ouvrir les boîtes sous hotte et laisser sécher environ 30 minutes.

Additif :	abréviation	concentration stock :	concentration finale :
Ampicilline (Sigma, U.S.A.)	Amp	500mg/ml	100µg/ml
5-bromo, 4-chloro, 3-indolyl-b-D-galactotryptone (Promega, U.S.A.)	X-gal	50mg/ml	40µg/ml
Isopropyl-b-D-thiogalactoside (Promega, U.S.A.)	IPTG	200mg/ml	40µg/ml

Tableau II-5: concentrations et additifs utilisés

5.7) Préparation de l'ADN plasmidique

La technique utilisée est ici celle de la minipréparation d'ADN plasmique (Ausubel, *et al.*, 1995). Cette technique d'extraction comprend 5 étapes successives: la lyse alcaline des cellules, la précipitation des débris cellulaires et des protéines, suivie de la précipitation de l'ADN plasmique et le lavage de cet ADN et finalement sa resuspension.

Méthode:

- Repiquer une colonie isolée issue d'une culture en milieu solide dans 5 ml de milieu de culture liquide (LB + Ampicilline).
- Incuber la culture liquide une nuit à 37°C sous forte agitation (250 rpm).
- Centrifuger 1,5 ml de la culture dans un tube de type eppendorf, 5 minutes à 15 000 rpm (Heraus Sepatech, Biofuge 17RS, rotor 1379, Belgique) et éliminer le milieu de culture.
- Resuspendre ce culot dans 300 µl de P1 (avec RNase A) (tableau II-6, page II-20).
- Ajouter 300 µl de P2 (tableau II-6, page II-20) et mélanger doucement, incuber 5 minutes à température ambiante.
- Ajouter 300 µl de P3 (tableau II-6, page II-20), mélanger doucement, laisser 10 minutes sur glace.
- Centrifuger 15 minutes à 4°C, 15000 rpm (Heraus Sepatech, Biofuge 17RS, rotor 1379, Belgique), récupérer le surnageant.
- Précipiter l'ADN en ajoutant 0,8 volume d'isopropanol (Merck, Allemagne), homogénéiser en agitant lentement.
- Centrifuger 15 minutes, 15000 rpm (Heraus Sepatech, Biofuge 17RS, rotor 1379, Belgique) et éliminer le surnageant.
- Laver l'ADN en ajoutant 300 µl d'éthanol (Merck, Darmstadt, Allemagne) 70% et recentrifuger pendant 15 minutes à 15000 rpm (Heraus Sepatech, Biofuge 17RS, rotor 1379, Belgique), 4°C.

Nom	Séquence coupée	Température d'incubation (°C)
Hind III	5'-A/AGCTT-3'	37
Alu I	5'-AG/CT-3'	37
Pst I	5'-CTGCA/G-3'	37
Bgl I	5'-GCCNNNN/NGGC-3'	37
Eco RI	5'-G/AATTC-3'	37

Tableau II-7: Sites de restriction des principales endonucléases utilisées

-Éliminer l'éthanol et sécher sous vide (Heto Vac, Analis, Belgique).

-resuspendre dans 20 μ l d' H₂O désionisée stérile.

Tampon P1: (stock à 4°C) RNase A 100 mg/ml (Worthington, U.S.A.) Tris-HCl 50 mM EDTA 10 mM (Merck, Allemagne)
Tampon P2: (stock à température ambiante) NaOH 200 mM (Merck, Allemagne) SDS 1% (Merck, Allemagne)
Tampon P3: (stock à 4°C) KAc 3,0 M, pH 5,5 (Merck, Allemagne)
Ethanol 70% (Merck, Allemagne): (stock à -20°C)

Tableau II-6: Solutions et tampons d'extraction d'ADN plasmique.

6) Etablissement de profils de restriction

Les profils de restriction permettent, par l'utilisation d'endonucléases spécifiques d'une courte séquence d'ADN palindromique (tableau II-7, verso page 19), de vérifier la présence ou l'absence de l'insert désiré au sein du plasmide. En effet, le vecteur plasmidique utilisé contient de nombreux sites de restriction permettant un diagnostic rapide par digestion simple.

Méthode:

- x μ l d'ADN issu de la minipréparation.
- Ajouter le tampon de restriction 10 fois fourni par le fabricant:
10% du volume final du mélange de restriction.
- x μ l d'eau distillée autoclavée pour atteindre le volume final.
- Enzyme de restriction. Entre 2 et 10 unités par μ g d'ADN à restreindre.

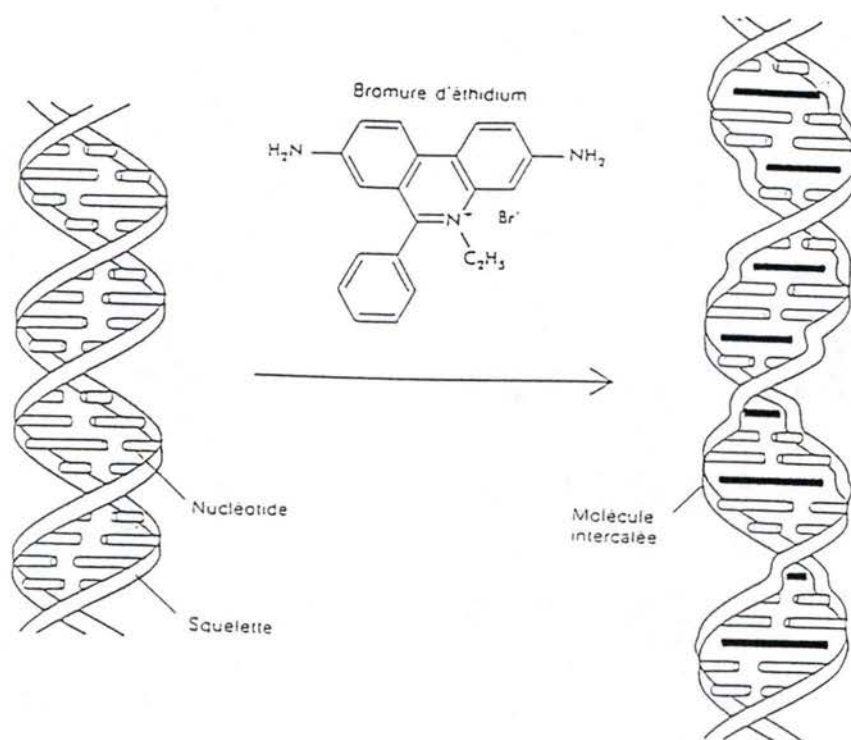


Figure II-9: Localisation du bromure d'ethidium dans une molécule d'ADN (Watson, J.D *et al.*, 1989)).

-Incuber 2 à 3 heures à 37°C (sauf recommandations du fournisseur).

-Faire migrer sur gel d'agarose.

7) Electrophorèse en gel d'agarose

L'électrophorèse en gel d'agarose est une méthode communément utilisée pour séparer, identifier mais aussi purifier des fragments d'ADN (Sambrook *et al.*, 1989).

Cette technique simple et rapide permet la séparation des fragments d'ADN selon leur taille. Des gels de pourcentage élevé en agarose sont requis pour une séparation optimale des fragments de petites tailles et inversement (tableau II-8, page II-21).

Les fragments d'ADN sont visualisés par marquage au bromure d'éthidium. Cette substance contient des groupes plans qui s'intercalent entre les bases de la double hélice d'ADN (figure II-9, verso page II-20).

L'ADN est ainsi fluorescent sous illumination ultra-violette. Il est cependant important de noter que cette fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ADN mais aussi à la taille des fragments. Celle-ci est approximée grâce à l'utilisation d'un marqueur dont les tailles des fragments sont connues.

Concentration en agarose (%)	Séparation efficace de molécules d'ADN (kb)
0,3	5-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7,0
1,2	0,4-6,0
1,5	0,2-3,0
2,0	0,1-2,0

Tableau II-8: Concentration optimale en agarose à utiliser selon la taille des molécules d'ADN à séparer.

Cuve à électrophorèse	(Horizon ^R 11-14, Gibco BRL Life technologies, Grande-Bretagne).
Transilluminateur	(longueur d'onde: 302 nm, Analis, Belgique).
Appareil Polaroid	(Modèle 44-16 MP4 Instant Camera System, U.S.A.).
Film Polaroid	(Duofilm, 667 Iso 3000 / 36°C, Jansen, Belgique).
TBE 1 x). On le prépare à partir d'une solution de stock TBE 5 x. Pour 1 litre, prendre: <ul style="list-style-type: none"> - 108 g de <i>Tris</i> (Merck, Allemagne). - 55 g d'<i>acide borique</i> (Merck, Allemagne). - 7,5 g <i>EDTA</i> (Merck, Allemagne). Agarose (Ultra Pure Grade Agarose, Bio Rad, Belgique). Bromure d'éthidium (stock: 500 µg/ml, Sigma Chemical Company, U.S.A.).	
Tampon d'échantillon <ul style="list-style-type: none"> - <i>Glycérol</i> 50 % (Merck, Allemagne). - <i>EDTA</i> 100 mM (Merck, Allemagne). - <i>SDS</i> 1 % (Merck, Allemagne). - <i>Bleu de bromophénol</i> 0,1 % (Across, Belgique). Marqueur ADN de poids moléculaire (figure II-10). <ul style="list-style-type: none"> - <i>Low DNA Mass Ladder</i> (Gibco, Grande-Bretagne) 2000, 1200, 800, 400, 200, 100 bp - <i>Marqueur II</i> (Boehringer Mannheim, Allemagne) 23130, 9420, 6560, 4361, 2322, 2027, 564 bp 	

Tableau II-9: Matériel utilisé pour l'électrophorèse en gel d'agarose.

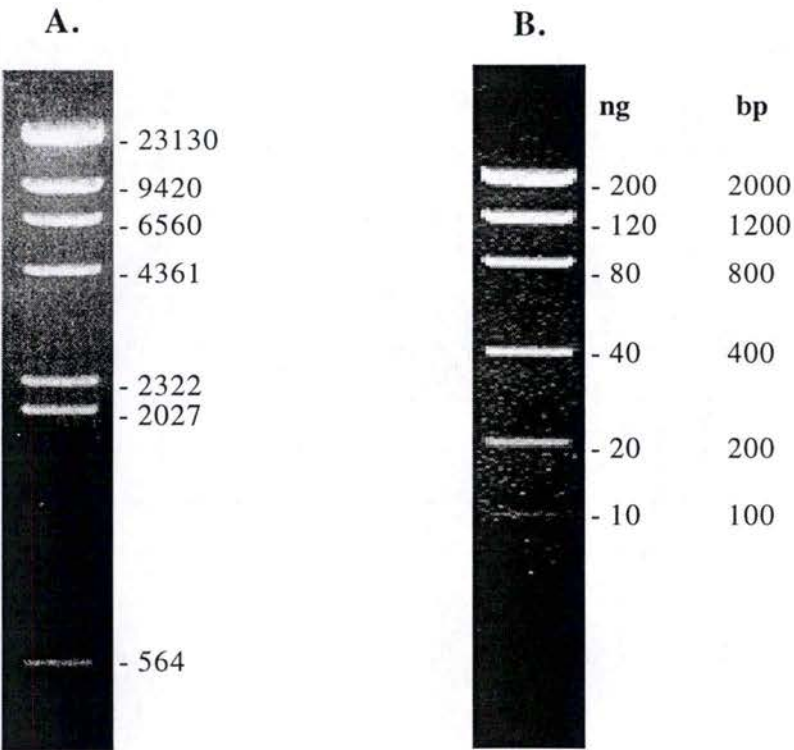


Figure II-10: Marqueurs de poids moléculaire après migration sur gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium.
A. Marqueur II: 2 µl sur gel d'agarose 1 % (d'après Boehringer Mannheim, Allemagne)
B. Low DNA Mass Ladder: 4 µl sur gel d'agarose 2 % (d'après Gibco, Grande-Bretagne).

Méthode : (matériel utilisé: tableau II-9, dos de la page II-21)

- Porter à ébullition un volume approprié de tampon TBE 1 fois additionné d'agarose (Gibco, Grande-Bretagne) jusqu'à obtenir une solution limpide.
- Ajouter le bromure d'éthidium (Sigma, USA) pour obtenir une concentration finale de 2 $\mu\text{g/ml}$.
- Couler sur le support *ad hoc* muni de peignes et laisser polymériser.
- Immerger le gel dans une cuve d'électrophorèse (remplie de TBE 1 fois.).
- Déposer les échantillons auxquels on a ajouté une solution d'alourdisseur (tampon d'échantillon) dans les puits et effectuer la migration au voltage désiré.
- Visualiser le gel sous UV (Transilluminateur, longueur d'onde 302 nm).

8) Extraction d'ADN de gel d'agarose

L'extraction et la purification d'ADN à partir d'un gel d'agarose sont réalisées selon le protocole du système commercial Quiaex II (Quiagen, Allemagne).

Principe:

L'extraction et la purification avec le kit Quiaex II Gel Extraction sont basées sur la solubilisation du gel d'agarose et sur l'absorption sélective et quantitative de l'ADN sur un gel de billes de silicate. On peut ainsi éliminer des contaminants tels que les protéines, les sels ou encore l'agarose. Mais le principal intérêt de cette technique réside dans la migration préalable de l'échantillon sur gel d'agarose permettant ainsi d'extraire uniquement les fragments d'ADN désirés.

Méthode:

La méthode est simple, elle consiste à découper la bande d'agarose contenant l'ADN voulu puis de purifier ce dernier grâce au kit.

- Séparer les fragments d'ADN par électrophorèse en gel d'agarose.
- Visualiser la bande intéressante sous ultra-violet et exciser le morceau d'agarose contenant la bande.
- Placer le morceau d'agarose dans un tube eppendorf et déterminer la masse de gel récupérée.
- Ajouter 3 volumes de tampon QX 1 pour des fragments allant de 100 bp à 4000.
- Resuspendre le gel de silice en l'agitant au vortex 30 secondes.
- Ajouter le gel de silice en proportion de la quantité d'ADN présente dans le gel. Celle-ci est évaluée par un marqueur semi-quantitatif (Mass Ladder, Gibco, Grande-Bretagne).
- Incuber à 50°C 10 minutes en agitant toutes les 2 minutes.

N.B:

L'absorption est optimale à $\text{pH} \leq 7,5$. Dès lors, après avoir dissous le morceau d'agarose vérifier le pH. S'il est supérieur à 7,5 l'ajuster avec de l'acétate de sodium 3M, pH 5,0.

- Centrifuger 30 secondes à 13000 RPM (biofuge Pico, Heraeus instrument, Belgique) et éliminer le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 500 μl de tampon QX 1 puis centrifuger 30 secondes comme précisé ci-dessus.
- Éliminer le surnageant.
- Resuspendre une deuxième fois le culot dans 500 μl de tampon PE auquel a préalablement été ajouté de l'éthanol selon les

spécifications du fabricant. Centrifuger une nouvelle fois comme précédemment.

-Sécher le culot à l'air jusqu'à ce qu'il devienne blanc.

-Eluer l'ADN dans 20 µl d'eau autoclavée.

9) Electrophorèse en gel de polyacrylamide

L'acrylamide est un monomère. En présence de radicaux, qui sont fournis par le persulfate d'ammonium (APS) et stabilisé par le TEMED (N,N,N',N'-tetraméthyléthylènediamine), une réaction en chaîne est initiée et les monomères d'acrylamide polymérisent en longues chaînes. Lorsque le N,N'-methylenebisacrylamide est ajouté, ces longues chaînes se polymérisent pour former un gel poreux.

Plus le pourcentage d'acrylamide du gel est important, plus la résolution de la migration de l'ADN est meilleure (tableau II-10), ce qui permet d'obtenir des gels résolutifs à la base près. Ils sont donc beaucoup plus précis que les gels d'agarose.

% d'acrylamide	taille des fragments d'ADN (bp)
3,5	100-2000
5,0	80-500
8,0	60-400
12,0	40-200
15,0	25-150

Tableau II-10: pourcentage d'acrylamide en fonction de la taille du fragment d'ADN

Méthode:(pour un gel 5 %)

-Réaliser le montage du support du gel.

-Préparer le gel (pour 50 ml):

-8,75 ml d'acrylamide 30% (tableau II-11, verso
page II-24)

Solution 30% d'acrylamide:	<ul style="list-style-type: none"> -29 g d'acrylamide (Bio Rad, Hercules, USA) -1 g N,N'-methylenebisacrylamide(Bio Rad, Hercules, USA) -Porter à 100 ml avec de l'eau et dissoudre à 37°C
Solution 10% d'ammonium persulfate:	<ul style="list-style-type: none"> -1 g ammonium persulfate (APS: Merck, Darmstad,Allemagne) -Porter à 10 ml avec de l'eau -Stocker à 4°C
Cuve d'électrophorèse: Gibco BRL Life Technologies, INC; modèle V15.17	

Tableau II-11: matériel utilisé pour les gels de polyacrylamide

- 2,5 ml de TBE 10X
- 38,45 ml d'eau désionisée
- 300 μ l d'APS
- 25 μ l Temed

- Couler le gel dans la cuve (tableau II-11, verso II-24) et placer le peigne.
- Laisser polymériser 1 heure.
- Placer le gel dans sa cuve et remplir celle-ci de TBE 1 fois.
- Réaliser un pré-run de 1 heure à 100 volts.
- Préparer les échantillons comme pour l'électrophorèse en gel d'agarose.
- Déposer les échantillons sur gels et faire migrer à 120 volts.

10) Northern blot

La technique de northern-blot permet de visualiser un ARN spécifique au sein d'une population hétérogène. Après extraction, les ARN totaux sont soumis à une électrophorèse en agarose afin d'obtenir une séparation en fonction de leur taille. Ils sont ensuite transférés sur une membrane. La révélation d'un ARN spécifique se fait alors grâce à une étape d'hybridation de cette membrane avec une sonde radioactive qui reconnaît au moins une vingtaine de bases de la partie codante du gène correspondant.

L'extrême sensibilité des ARN vis-à-vis des RNases, enzymes très répandues et très stables, implique la nécessité de travailler avec un très grand soin (porter des gants) et dans les conditions les plus stériles possible (conditions dites RNases-free) à toutes les étapes du northern-blot.

10.1) Extraction des ARN totaux

Nous avons extrait l'ARN, des fibroblastes IMR-90 stressés sous 450 μ M d' H_2O_2 et WI-38 ayant subi 5 stress successifs sous 40 μ M de t-BHP, en suivant 2 méthodes: l'une est basée sur l'extraction différentielle de l'ARN par des solvants organiques (le phénol, à pH acide, et le

PBS	Tampon phosphate 10 mM stérile additionné de NaCl 0,9 %, pH 7,4.
Trizol	Trizol™ reagent (Gibco, Grande-Bretagne).
Chloroforme, Isopropanoléthanol	75 % v/v (Merck, Allemagne).
SDS	Solution stock de SDS 10 % préparée avec de l'eau désionisée, RNase-free au laboratoire.
Tubes en verre de 30 ml	(Corex, U.S.A.) préalablement nettoyés avec du SDS 1 %, rincés avec de l'eau désionisée et mis au four à 180°C pendant 8 h.
Centrifugeuse	(J-21B Beckman; rotor JA-20 (U.S.A.)).
Centrifugeuse Sorvall	(Rotor HB4 basculant (U.S.A.)).
Cuvette	Pouvant contenir 50 µl (Pharmacia LKB, Suède), lavée au SDS 1 % avant d'être rincée plusieurs fois à l'eau désionisée pour éviter toute contamination de RNases.
Evaporateur sous vide	(Hetovac, Analis, Belgique).
Spectrophotomètre	(Ultraspec II Biochrom, Pharmacia LKB, Suède).

Tableau II-12: Matériel utilisé pour l'extraction des ARN totaux.

chloroforme); la seconde utilise une précipitation pour séparer l'ARN de haut poids moléculaire des autres types d'acides nucléiques (matériel repris en tableau II-12, dos page II-25). L'extraction de l'ARN comprend les étapes suivantes:

Homogénéisation:

Afin d'isoler les ARN totaux de cellules en culture, nous avons utilisé une solution commerciale, le Trizol. Il s'agit d'une solution monophasique de phénol et d'isothiocyanate de guanidine. Cette méthode est une dérivée de la méthode d'isolation en une seule étape développée par Chomczynski et al. en 1987. L'isothiocyanate de guanidine contenu dans le Trizol maintient l'intégrité de l'ARN en inhibant les RNases, tout en lysant rapidement et complètement les cellules et en dissolvant les composants cellulaires. Dans ces conditions, les nucléoprotéines se dissocient des acides nucléiques par perte de leur structure secondaire.

L'étape d'homogénéisation est réalisée à température ambiante. Au terme de la stimulation, les cellules sont rincées 2 fois avec 7 ml de PBS. On ajoute ensuite 7,5 ml de Trizol par boîte. Il est conseillé d'ajouter 1 ml de Trizol par 10 cm² de superficie de boîte de culture car une quantité insuffisante de Trizol peut entraîner une contamination de l'ARN par de l'ADN.

On homogénéise les cellules et on laisse incubé la boîte à plat pendant une dizaine de min tout en agitant de temps en temps. On transfère ensuite la solution contenant l'homogénat cellulaire dans un tube stérile de 50 ml.

Phase de séparation:

On ajoute ensuite 1,5 ml de chloroforme. La solution est alors agitée vigoureusement sur un agitateur mécanique pendant 15 sec puis laissée à incubé à température ambiante pendant 2 à 3 min. Elle est ensuite transférée dans un tube Corex puis centrifugée à 8.500 rpm (12.000 g) pendant 20 min à 4°C dans la centrifugeuse J-21B (compensation=1). La solution est séparée en une phase organique phénol-chloroforme, dans le fond du tube, en une interphase (ces 2 phases contenant les protéines et l'ADN) et enfin en une phase aqueuse supérieure incolore qui contient les ARN. La phase aqueuse est récupérée et transférée dans un autre tube Corex.

Précipitation de l'ARN:

On précipite les ARN en ajoutant 3,75 ml d'isopropanol à chaque tube. On insuffle de l'air à l'aide d'une pipette pasteur stérile pour bien

mélanger le tout. Cette solution est alors incubée pendant 30 min à température ambiante avant d'être centrifugée à 8.500 rpm (12.000 g) pendant 25 min à 4°C dans la centrifugeuse Sorvall. Le surnageant (qui contient l'ADN et les protéines) est enlevé en versant le contenu des tubes délicatement et en les maintenant renversés pour éliminer tout l'isopropanol. Un dépôt granuleux correspondant à l'ARN est alors visible au fond des tubes.

Lavage de l'ARN :

L'ARN précipité est alors lavé dans 7,5 ml d'éthanol 75 % froid. L'échantillon est mélangé en agitant à la main puis centrifugé à 6.500 rpm (7.500 g) pendant 30 min à 4°C dans la centrifugeuse Sorvall. On décante ensuite le surnageant.

Dissolution de l'ARN:

Le culot d'ARN est séché sous vide pendant 5 à 10 min à l'aide de l'évaporateur sous vide tout en évitant qu'il ne le sèche trop, ce qui rendrait difficile la dissolution de l'ARN. On dépose de suite le tube Corex sur glace et on resuspend le culot dans 50 µl d'eau RNase-Free. On transfère l'ARN dans un microtube stérile que l'on congèle à -70°C après avoir estimé la quantité d'ARN.

Estimation de la quantité d'ARN:

Chaque échantillon d'ARN est dilué 50 fois (5 µl d'ARN dans 45 µl d'eau désionisée). Si le matériel est trop concentré, on l'incube pendant 10 min à 55°C avant de prélever un aliquote. L'estimation de la quantité d'ARN se fait par lecture de l'absorbance des acides nucléiques à 260 nm au spectrophotomètre. Pour évaluer le degré de pureté de la préparation, on réalise également une lecture à 280 nm. Des préparations pures en ARN ont un rapport $D.O._{260}/D.O._{280}$ compris entre 1,7 et 1,9. Des valeurs inférieures peuvent refléter une contamination de la préparation par du phénol ou des protéines, une mauvaise dissolution de l'ARN (d'où l'intérêt de le chauffer à 55°C), ou encore une trop grande concentration d'ARN. La concentration en ARN est calculée en sachant qu'une solution d'ARN d'une densité optique égale à 1 à 260 nm contient environ 40 µg d'ARN/ml.

Cuve à électrophorèse	(Horizon ^R 11-14, Gibco BRL Life technologies, Grande-Bretagne): lavée avec du SDS 1 %, rincée et laissée une nuit dans du SDS 1 % afin d'éliminer toute contamination de RNases. Le lendemain, la cuve est rincée abondamment avec de l'eau désionisée.
Evaporateur sous vide	(Hetovac, Analis, Belgique).
Transilluminateur	longueur d'onde: 302 nM (Analis, Belgique).
Appareil Polaroid	Modèle 44-16 (MP4 Instant Camera System, U.S.A.).
Film Polaroid	Duofilm, 667 Iso 3000 / 36°C (Jansen, Belgique).
Papier Whatman	3 MM (Macherey-Nagel, Allemagne).
Membrane de nylon	(1 209 272, Boehringer, Allemagne).
Bacs et plaques en verre	Lavés au SDS 1 % puis rincés à l'eau désionisée.
<div> <div> Gel d'agarose 1%, pour 100 ml <ul style="list-style-type: none"> - 1 g d'agarose (Ultra Pure Grade Agarose, Bio Rad, Belgique). - 86 ml d'eau désionisée . - 10 ml de <i>MOPS</i> 10 x concentré. Porter à ébullition jusqu'à parfaite dissolution. Quand la température redescend à 65 °C, ajouter 4 ml de formaldéhyde à 37 % (Fluka Chemika Biochemika, Italie). </div> <div> Tampon d'électrophorèse <i>MOPS</i> 1 x dilué à partir d'une solution stock 10 x, solution comprenant : <ul style="list-style-type: none"> - <i>MOPS</i> 0,2 M (acide 3-(morpholino)-propanesulfonique (Sigma Chemical Company, U.S.A.). - <i>acétate de sodium</i> 0,05 M (Merck, Allemagne). - <i>EDTA</i> 0,01 M (Merck, Allemagne). La solution est mise à pH 7,0 puis autoclavée pendant 15 min à 120°C et stockée à l'abri de la lumière. </div> </div> <div> <div> Tampon d'échantillon <ul style="list-style-type: none"> - 2 µl de <i>MOPS</i> 10 x. - 3,3 µl de <i>formaldéhyde</i> 37% (Fluka Chemika-Biochemika, Italie). - 10 µl de <i>formamide</i> (Sigma Chemical Company, U.S.A.). </div> <div> Tampon de charge <ul style="list-style-type: none"> - <i>Glycérol</i> 50 %. - <i>EDTA</i> 1 mM, pH 8,0. - <i>Bleu de bromophénol</i> 0,4 %. - <i>Xylène cyanol</i> 0,4 % (Sigma Chemical Company, U.S.A.). </div> <div> Bromure d'éthidium 500 µg/ml (Sigma Chemical Company, U.S.A.). </div> <div> 10 x SSC: NaCl 3 M <ul style="list-style-type: none"> - Na-citrate 0,3 M; pH 7,0. </div> </div>	

Tableau II-13: Matériel utilisé pour l'électrophorèse et le transfert.

10.2) Electrophorèse

L'électrophorèse en gel d'agarose permet de séparer les fragments d'ARN en fonction de leurs tailles différentes au sein du gel. Elle est pratiquée en présence d'un agent dénaturant, le formaldéhyde. Cet agent détruit la structure secondaire complexe des ARN qui interviendrait aussi dans leur mobilité.

Méthode: (matériel tableau II-13 voir verso page II-27)

- Laver la cuve d'électrophorèse avec une solution de NaOH 1M pendant 20 minutes ou une nuit dans une solution 10% SDS puis rincer à l'eau -0,5 DEPC.
- Couler le gel dans la cuve munie d'un peigne lui aussi lavé comme ci-dessus.
- Pendant la polymérisation du gel préparer les échantillons, 20 ng par échantillon sont prélevés, lyophilisés sous vide puis resuspendus dans 4,7 µl d'eau désionisée autoclavée. Ajouter ensuite le tampon d'échantillon. Ajuster le volume avec de l'eau-0,5 DEPC pour atteindre 20 µl.
- Dénaturer l'ARN en chauffant les échantillons à 65°C pendant 15 minutes. Dès que les échantillons sont enlevés du bain à 65°C, le reste de la manipulation doit être réalisé rapidement: refroidir sur glace 2 minutes, ajouter 2 µl de tampon de charge par échantillon, mélanger et déposer sur gel. Ce gel aura été préalablement coloré, pendant 20 minutes, dans 300 ml d'eau-0,5 DEPC contenant 15 ml de bromure d'éthidium à 10mg/ml. Le bromure d'éthidium est nécessaire pour la visualisation ultérieure des bandes d'ARN par illumination sous U.V.
- Electrophorèse (théoriquement 7,5 volt/cm): 100 volts pendant 4 heures ou 150 volts pendant 2h30 approximativement. Toutes les 90 minutes à 100 volts ou toutes les 50 minutes à 150 volts,

Le gel retourné	Le pourtour du gel est entouré de parafilm afin d'éviter que le liquide du réservoir ne soit absorbé par les papiers qui seront au-dessus du gel le court-circuitant.
La membrane de nylon	De la grandeur du gel. (Hylond-N1;Amershan)
Une feuille de papier Whatman	Humidifiée dans du 10 x SSC.
Les feuilles de papier buvard	De la grandeur du gel.
Une plaque en verre	
Un poids de 500 g	Permet un bon contact entre les différents éléments du système.

Tableau II-14: Montage de transfert.

le tampon d'électrophorèse (tableau II-13 verso page II-27) est enlevé de la cuve et mélangé.

- On observe ensuite le gel sous une lampe à U.V. Si l'ARN n'est pas dégradé, on observe 2 bandes principales d'ARN ribosomal d'environ 5 kilobases (kb) (ARN 28 S) et d'environ 2 kb (ARN 18 S), et une bande d'ARN de transfert compris entre 0,1 et 0,3 kb (ARNt 5 S) (figure II-11 au dos de la page II-29). Si l'ARN est dégradé, une traînée est observée sur le gel d'agarose.

10.3) Transfert

L'étape de transfert nous permet de faire passer les ARNm du gel d'agarose sur une membrane de nylon qui va permettre par la suite la réalisation d'hybridation.

Méthode: (matériel tableau II-14 verso page II-28)

- On prépare le gel au transfert en le plongeant dans 300 ml d'une solution de NaOH 50mM pendant 15 minutes sous une légère agitation. En effet, la présence de bromure d'éthidium et du tampon de migration peut limiter l'efficacité du transfert des ARN. Rincer 3 fois au moyen d'eau-0,5 DEPC.
- Le gel est ensuite incubé pendant 30 minutes dans 300 ml de SSC 10X afin d'éliminer le plus possible le bromure d'éthidium et le formaldéhyde. Cela permet également d'équilibrer le gel avec le SSC 10X.
- Pendant ce temps, on découpe un morceau de membrane de nylon, 10 morceaux de papier Whatman et une pile de papiers buvards de ± 5 cm d'épaisseur.

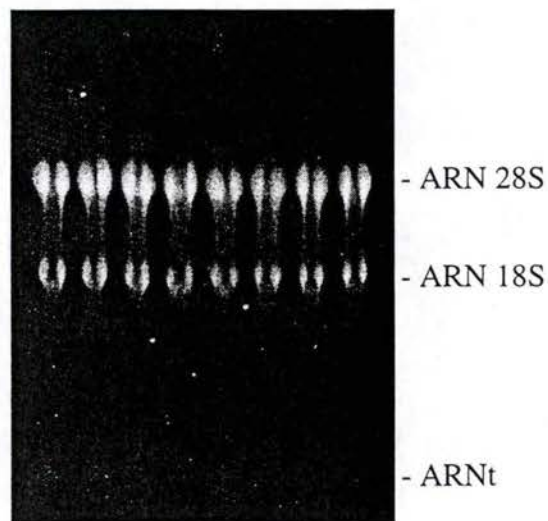


Figure II-11: Vérification de la qualité des ARN totaux extraits des cellules après migration sur gel d'agarose dénaturant (1 %). Deux bandes principales correspondant aux ARN ribosomaux 28 S et 18 S sont visibles ainsi que dans un moindre mesure les ARN de transfert.

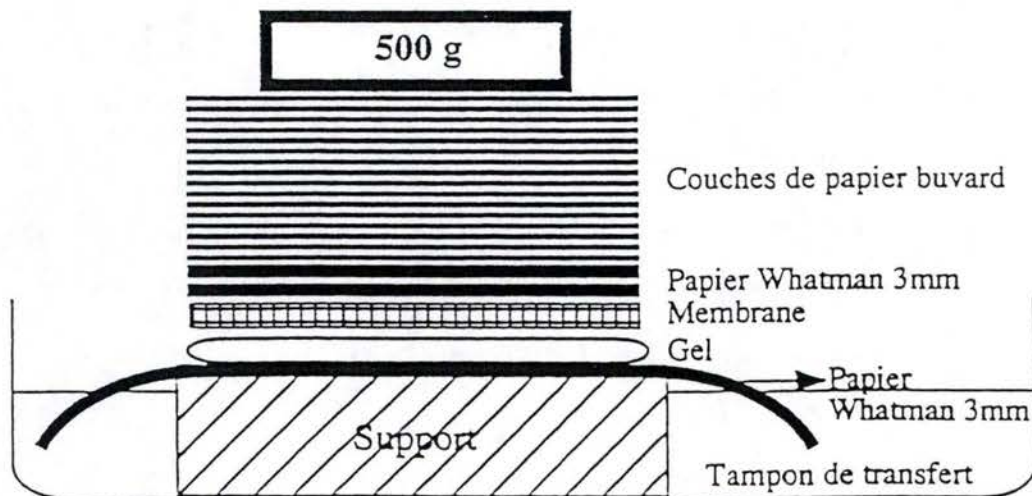


Figure II-12: Transfert par capillarité des acides nucléiques d'un gel d'agarose vers la membrane.

- On réalise ensuite le montage suivant (figure II-12 au dos de la page II-29): on place, dans un bac contenant du 10 x SSC, un support en verre sur lequel on met une feuille de papier Whatman (plus longue et plus large que le gel) préalablement imbibée de tampon de transfert.
- Eliminer les bulles d'air en roulant une pipette de 10 ml sur le montage.
- Le montage doit être parfaitement plan pour éviter un transfert disymétrique, il faut donc vérifier le niveau.
(les matériels sont décrits dans le tableau II-14 verso page II-28). Le but de ce montage est d'établir un flux de 20 x SSC à travers le gel vers la membrane.
- Incuber une nuit.
- Le lendemain, on démonte délicatement le système et on vérifie que le transfert s'est bien passé, en plaçant le gel sous U.V.
- La membrane est ensuite rincée dans 300 ml de SSC 2X pendant 1 minute.
- On place la membrane sur une feuille de papier Whatman et on la laisse ensuite sécher à l'air libre. Afin de protéger les molécules d'ARN contre une dégradation spontanée ou par des nucléases, on les immobilise sur la membrane en chauffant celle-ci à 80°C pendant 1 heure. Toutefois, ceci n'empêche pas la perte d'ARNm lors des hybridations et déshybridations successives sur la membrane.

Kit de marquage	Oligolabelling Kit de Pharmacia (USA)
Mélange réactionnel	Pour 50 ml: <ul style="list-style-type: none"> - 50 ng de sonde pour un volume total de 34 ml de tris-EDTA - dénaturer la sonde en la plaçant 3 minutes à 100°C puis 2 minutes à 4°C - 10 µl d'un mélange de dATP, dGTP, DTTP fourni dans le kit (Reagent Mix) - 5 µl de [α-³²P] dCTP 3000 Ci/m mole (NEN Dupont, Belgique). - 1 µl de klenow
Colonnes Quick Spin Sephadex G-25 Fine	(Boehringer, Allemagne).
Tampon TE	Tris-HCl 10 mM; pH 8,0; EDTA 1mM, autoclavé.
Centrifugeuse	Jouan B.311 (Jouan, France).
Liquide scintillant	Aqualuma (Lumac, Pays-Bas).
Compteur à scintillation β	(Beckman LS1801, U.S.A.).

Tableau II-15: Matériel utilisé pour le marquage des sondes.

10.4) Marquage des sondes

Les sondes utilisées pour révéler la présence des ARN nous ont été fournies par le Dr.Gonos de l'Institut de Recherche Biologique et de Biotechnologie d'Athènes, Grèce.

Méthode:

- Le mélange réactionnel décrit dans le tableau II-15 (verso de la page II-30) est incubé 1 heure à 37 °C.
- Les oligonucléotides sont ensuite séparés des nucléotides radioactifs grâce à une purification sur colonne Quick Spin(G 25, Boehringer/Mannheim, Allemagne): le gel de Sephadex est d'abord homogénéisé avant d'être asséché par une centrifugation de 4 min à 2.400 rpm (400 g).
- L'échantillon déposé au centre de la colonne subit ensuite une centrifugation similaire. La colonne est rincée 4 fois avec 50 µl d'eau désionisée autoclavée, chaque rinçage étant suivi d'une centrifugation de 4 min à 400 g. L'oligonucléotide marqué est généralement récolté dans l'éluat du second rinçage.
- Evaluer le marquage de la sonde sur 4 fois 1 µl de sonde auquel on ajoute 5 ml de liquide scintillant par comptage du nombre de désintégrations par minute à l'aide du compteur à scintillation.

Remarque : vu le faible temps de demi-vie du ^{32}P (approximativement 14 jours), l' $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ employé ne doit pas être âgé de plus de deux semaines. De plus, il convient d'ajuster le volume d' $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ à ajouter à la réaction de marquage en fonction de son âge (activity date) : 5 µl est donc la quantité de base qui correspond à une activité maximale (100%) du nucléotide marqué.

Solution de préhybridation qui contient: <ul style="list-style-type: none"> - <i>Formamide</i> (Sigma Chemical Company, U.S.A.), 50 % (stock 100 %). - <i>SSPE 5 x</i> préparé à partir d'un stock 20 x, pH 7,4: <ul style="list-style-type: none"> . NaCl 3,6 M. . $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ 0,2 M. . EDTA 0,02M. - <i>SDS</i> 0,3 % (stock 10 %). 			<ul style="list-style-type: none"> - <i>Denhart 5 x</i> préparé à partir d'un stock 20 x: <ul style="list-style-type: none"> . 2 g de polyvinylpyrrolidon (Sigma Chemical Company, U.S.A.). . 2 g de ficoll dans 100 ml d'eau désionisée (type 400; Pharmacia, Suède). - <i>SSDNA 600</i> $\mu\text{g/ml}$ (stock: 10 mg/ml) (Sigma Chemical Company, U.S.A.). - <i>Dextran sulfate 5%</i> autoclavé
<ul style="list-style-type: none"> - Préchauffer la solution de préhybridation à 42°C (pour éviter une renaturation de l'ADN ajouté par la suite). - Ajouter l'ADN de sperme de saumon bouilli pendant 10 minutes puis placer sur glace 5 minutes. Il est préparé à partir d'une solution stock de 10 mg/ml conservée à -20°C. <p>N.B.:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Le formamide réduit le taux de renaturation de l'ADN car il déstabilise les doubles brins d'ADN ce qui permet de diminuer la température d'hybridation. - Les phosphates du SSPE miment le squelette de phosphodiester des acides nucléiques de la sonde et donc bloquent efficacement la membrane de nylon chargée positivement qui a une affinité naturelle pour les sondes nucléiques chargées négativement. 			
Solution d'hybridation contenant de la solution de préhybridation, plus: <ul style="list-style-type: none"> - 10 % de <i>dextran sulfate</i> (Sigma Chemical Company, U.S.A.). - La sonde dénaturée (bouillie pendant 10 min). <p>N.B.:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Le dextran sulfate, polymère anionique, augmente la viscosité macroscopique (chauffer un peu pour le dissoudre). Il a un effet d'exclusion des molécules d'eau ce qui augmente la concentration en sonde et donc favorise l'hybridation. Un phénomène similaire a lieu en incluant du Denhart dans la solution. 			
Solution de lavage I 2 x SSC (stock 20 x SSC). <i>SDS</i> 0,1 % (stock 10%), mis à volume avec de l'eau désionisée.	Solution de lavage II 0,5 x SSC). <i>SDS</i> 0,1 % mis à volume avec de l'eau désionisée.	Solution de lavage III 0,1 x SSC. <i>SDS</i> 0,1 % mis à volume avec de l'eau désionisée.	

Tableau II-16: Matériel utilisé pour la préhybridation, l'hybridation et les lavages des membranes.

10.5) Préhybridation, hybridation et lavages des membranes

Méthode: (matériel repris dans le tableau II-16, dos de la page II-31)

- Immerger la membrane entre 4 et 5 heures à 42°C sous faible agitation, elle est déposée dans un sac plastique hermétique duquel ont été ôtée toutes les bulles d'air en roulant une pipette de 10 ml, avant fermeture, sur le sac contenant la solution de préhybridation (350 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ de membrane)(tableau II-16, verso page II-31). Cette étape de préhybridation permet d'équilibrer la membrane dans un tampon semblable à celui utilisé pour l'hybridation. Cette étape permet aussi de saturer la membrane avec de l'ADN dénaturé d'origine biologique différente des ARN d'intérêt (en l'occurrence de l'ADN de sperme de saumon), ce qui diminue les risques de liaison non spécifique de la sonde avec la membrane, et donc le bruit de fond.
- Ajouter ensuite à la sonde radioactive dont l'activité spécifique est de 1×10^8 cpm/ μg de l'ADN de sperme de saumon à raison de 60 μl de SSDNA par 5 ml de volume d'hybridation.
- Dénaturer ce mélange en le chauffant 10 minutes à 100°C puis en le plaçant 5 minutes sur glace.
- Ouvrir le sac et y additionner le mélange sonde SSDNA dénaturé.
- Refermer le sac hermétiquement en évitant toute bulle d'air.
- Cette étape d'hybridation est réalisée à 42°C, sous faible agitation, pendant une nuit. Au terme de cette période d'hybridation, on enlève la solution d'hybridation. On lave la membrane 2 fois dans 150 ml de solution de lavage I (tableau II-16, verso page II-31) pendant 30 min à température

ambiante puis 2 x dans 150 ml de solution de lavage II pendant 30 min entre 42 et 55°C. Il est parfois nécessaire pour éliminer de manière plus efficace le bruit de fond de faire 1 ou 2 lavages supplémentaires avec la solution de lavage III à une température entre 55°C et 62°C.

- On vérifie que le bruit de fond n'est pas trop important à l'aide du compteur Geiger.
- Placer la membrane sur un morceau de papier Whatman pour absorber l'excès de tampon. La membrane est alors enveloppée de cellophane afin qu'elle reste humide. Ceci est important quand on veut par la suite décrocher la sonde et réhybrider la membrane avec une autre sonde.
- Dès la fin des lavages, l'"Instant Imager" permettra une première visualisation et une quantification des bandes observées. Suivant le niveau d'expression de l'ARNm analysé, le temps d'exposition nécessaire pour obtenir un signal suffisant variera entre 5 minutes et 8 heures.
- A -70°C, dans une cassette, mettre en présence la membrane et un film d'autoradiographie (utiliser de préférence des films β -max de Amersham). Le temps d'exposition varie ici entre 12 heures et une semaine suivant l'ARNm analysé. L'analyse à l'Instant Imager donnera une évaluation approximative de ce temps. Le développement du film sera réalisé en déposant celui-ci successivement dans les trois bains suivants :
 - 5 minutes dans 300 ml d'une solution de révélateur 20% dans de l'eau distillée.
 - 30 secondes dans 300ml d'eau distillée.
 - 4 minutes dans 300 ml d'une solution de fixateur 20% dans de l'eau distillée.

10.6) Elimination de la sonde

Les membranes pouvant être réutilisées plusieurs fois (± 5), il convient, une fois les résultats obtenus, de réaliser des lavages puissants afin d'éliminer la sonde fixée de manière spécifique à la membrane.

- Amener à ébullition 1 litre de tampon SSC 0,01x ; 0,01% SDS.
- Réaliser 5 lavages de trois minutes au moyen de cette solution bouillante. Le volume d'un lavage est de plus ou moins 150 ml.
- Contrôler la radioactivité de la membrane au compteur Geiger ou en exposant un nouveau film.

10.7) Conservation des membranes

Méthode:

- Tant que la sonde n'a pas été décrochée de la membrane, celle-ci doit impérativement rester humide. La conserver à 4°C, emballée dans du papier Saran, humidifiée par la dernière solution avec laquelle elle a été en contact.
- Si la sonde a été enlevée, sécher la membrane en la déposant pendant 5 minutes, à l'air libre, sur une feuille de papier Whatmann. La conserver à 4°C, emballée dans une feuille de papier Saran, sèche.

11) Séquençage

La technique de séquençage utilisée est un séquençage à fluorescence par PCR avec le système ABI.PRISM Dye terminator cycle sequencing ready reaction kit (Perkin-Elmer (Roche), USA).

On réalise sur le fragment à séquencer une PCR en présence d'une seule des 2 amorces (sens ou anti-sens) permettant l'amplification en PCR simplex. Le mix PCR contient un mélange adéquat de nucléotides terminateurs marqués par un agent fluorescent (fluorescéine,

rhodamine,...) bloquant l'élongation lorsqu'ils sont insérés dans l'amplicon, et de nucléotides non marqués permettant l'élongation.

La réaction PCR produit alors un ensemble d'amplicons de taille variable et terminés par un nucléotide fluorescent. Cette population ensuite déposée sur gel d'acrylamide à haute résolution migre suivant la taille des fragments. Sur ce profil de migration passe un laser qui excite les marqueurs fluorescents réémettant sous une longueur d'onde qui leur est propre, la succession des réémissions donnant la séquence.

La séquence sens s'obtiendra si on met l'amorce anti-sens et inversement pour la séquence anti-sens.

Méthode:

- Placer dans un tube à PCR 100 à 150 ng de matrice à séquencer.
- Ajouter l'amorce sens ou anti-sens à une concentration finale de 3,2 pmoles.
- Compléter avec de l'eau pour obtenir un volume final de 10 µl après ajout du mix de nucléotides.
- Mettre 4 µl de terminator Ready Reaction Mix (Perkin-Elmer (Roche), USA) contenant la polymérase, les dNTPs, les dNTPs terminateurs fluorescents et le tampon PCR.
- Réaliser 25 cycles PCR dans les conditions:
 - Dénaturation à 96°C 10 secondes
 - Hybridation à 50 °C 5 secondes
 - Elongation à 60°C pendant 4 minutes
- Pour chaque réaction de séquençage, préparer un eppendorf de 1,5 ml dans lequel on place 25 µl d'éthanol 95% (Merck, Allemagne), 1 µl de NaAc 3 M pH 4,6 ou 5,2 (Merck, Allemagne) et les 10 µl de la réaction PCR de séquençage.
- Agiter fortement et placer sur glace 10 minutes.
- Centrifuger 30 minutes à 15000 rpm (Heraus Sepatech, Biofuge 17 RS, rotor 1379, Belgique), 4°C.
- Éliminer le surnageant.

- Laver avec 250 μ l d'éthanol 70% (Merck, Allemagne).
- Centrifuger 15 minutes à 15000 rpm (Heraus Sepatech, Biofuge 17 RS, rotor 1379, Belgique), 4°C.
- Eliminer le surnageant et sécher le culot sous vide.
- Les échantillons sont ensuite déposés sur un gel d'acrylamide 4%, la lecture de la séquence étant effectuée de manière automatique par l'appareil ABI.PRISM.
- Une fois la séquence obtenue, on vérifie son identité sur un programme informatique appelé Blast NCBI ou BCM search launcher disponibles sur Internet aux adresses respectives <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-blast?Jform=0> et <http://kiwi.imgen.bcm.tmc.edu:8088/search-launcher.html>.

RESULTATS ET DISCUSSION

1) Délétion de 4977 bp dans l'ADN mitochondrial et vieillissement cellulaire in vitro

En première partie de ce travail, nous avons testé une hypothèse quant à un mécanisme commun conduisant au vieillissement cellulaire normal et au vieillissement accéléré par des stress. Il s'agit de l'hypothèse selon laquelle le niveau énergétique cellulaire pourrait favoriser l'apparition des dommages causant eux-mêmes la surexpression de certains gènes typiquement surexprimés lors du vieillissement. Parmi les nombreuses raisons possibles pouvant expliquer un rôle éventuel du niveau énergétique, des délétions de grands fragments de l'ADN mitochondrial pourraient perturber l'expression de gènes nécessaires à la respiration cellulaire.

Une diminution d'activité de la cytochrome c oxydase a été corrélée avec la présence de la délétion de 4977 bp au sein du génome mitochondrial qui a lieu de plus en plus fréquemment au cours du vieillissement. Lezza *et al.* ont en effet montré que, au cours du vieillissement humain, l'activité de la cytochrome c oxydase diminue en relation inverse par rapport à l'augmentation du nombre de délétions de 4977 bp.

Dans l'introduction, nous avons vu que de multiples types cellulaires connaissent un grand nombre de délétions, en proportions diverses. Nous nous sommes limités ici à déterminer si la délétion la plus communément observée, celle de 4,977 kb, apparaît lors du vieillissement fibroblastique *in vitro*, normal ou accéléré par des stress successifs sublétaux sous t-BHP. De plus, nous avons développé une méthode de PCR compétitive basée sur l'usage des deux standards internes, et permettant d'évaluer le nombre de copies d'ADN mitochondrial délétées par rapport au nombre total de copies d'ADN mitochondrial.

Nous avons vu dans l'introduction que des études sur cette délétion ont déjà été réalisées à partir de biopsies. Ces travaux ont permis de voir une correspondance entre une augmentation du taux de délétions et le vieillissement normal. Toutefois aucune de ces études n'aborde le vieillissement *in vitro* normal et accéléré par des stress et aucune méthode réellement quantitative n'a jamais été utilisée sur du matériel humain.

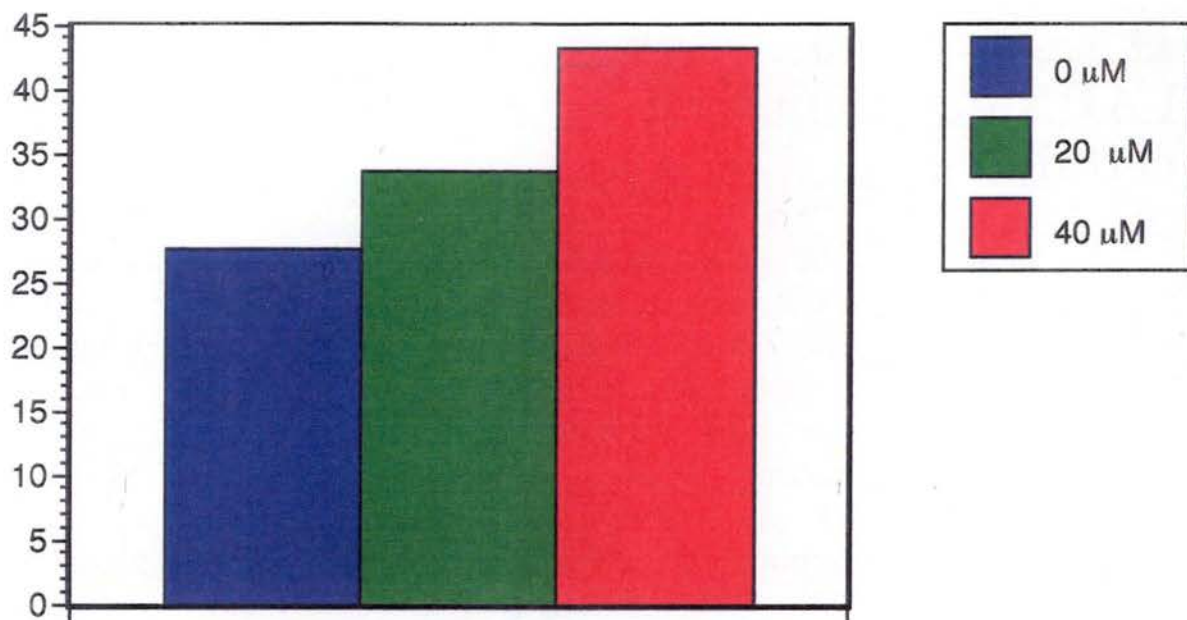


Figure III-1: Pourcentage des fibroblastes à passage en culture 36 présentant une activité β -gal associée à la sénescence 2 jours après 5 stress successifs à 40 et 20 μ M de t-BHP.

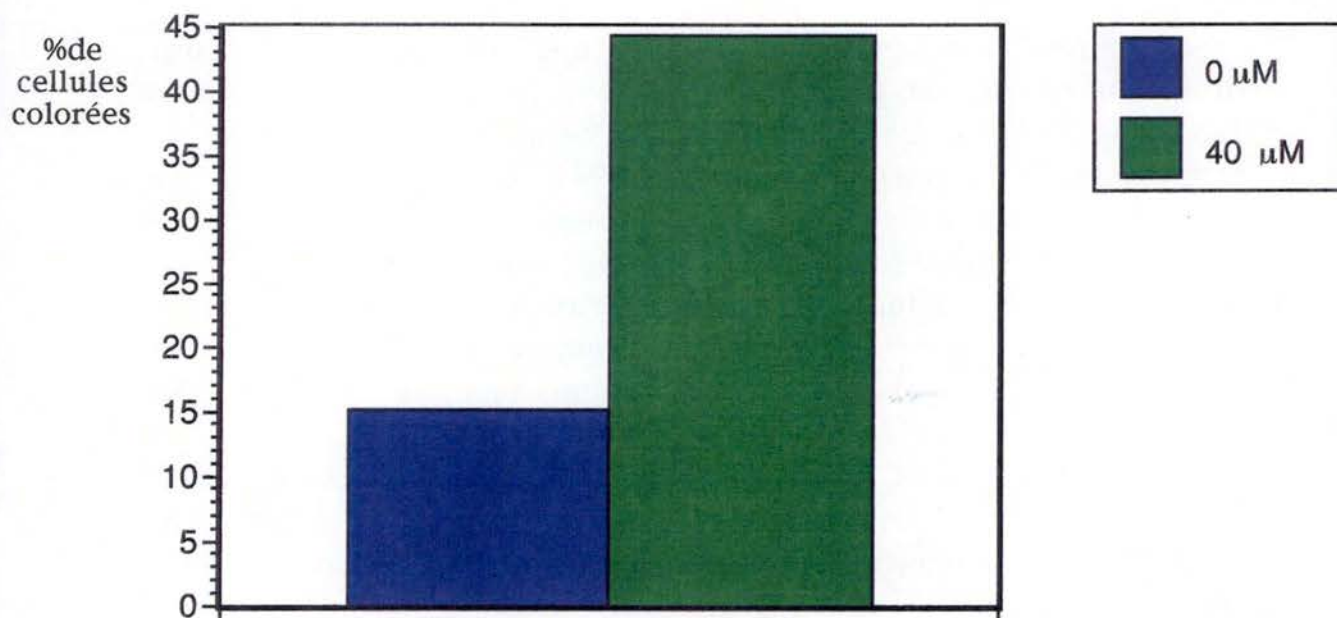


Figure III-2: Pourcentage des fibroblastes à passage en culture 28 présentant une activité β -gal associée à la sénescence 2 jours après 5 stress successifs à 40 μ M de t-BHP.

1.1) Mise en évidence de la délétion lors du vieillissement *in vitro* normal et accéléré par des stress

Pour mettre en évidence la délétion commune de 4,977 kb, lors du vieillissement *in vitro* normal et accéléré par stress au t-BHP, nous avons utilisé des fibroblastes de poumon humain de souche WI-38.

1.1.1) Mise au point des conditions de stress:

Des jeunes cellules (passage en culture 28) ont été soumises à cinq stress successifs de une heure au moyen de t-BHP 40 μ M dilué dans du milieu de culture BME contenant 10% de sérum bovin foetal. Les stress sont espacés de 24 heures. Des cellules au passage en culture 36 ont également subi un traitement similaire, à des concentrations de 20 et 40 μ M en t-BHP.

48 heures après le dernier stress, l'effet du traitement sur le vieillissement cellulaire a été quantifié en déterminant le pourcentage de cellules présentant l'activité β -galactosidase associée à la sénescence. Ce test a aussi été réalisé sur un contrôle dont on change le milieu de culture en même temps que l'on stresse les cellules test, ce milieu étant en tout point semblable au milieu de culture utilisé lors des stress, sauf bien sûr qu'il ne contient pas de t-BHP.

Par rapport au contrôle à passage en culture 36 qui a subi cinq changements de milieu sans t-BHP, on passe de 28% à 34% de cellules positives pour l'activité β -galactosidase associée à la sénescence à 20 μ M en t-BHP et de 28% à 43% à 40 μ M en t-BHP (voir figure III-1, verso page III-2), soit des augmentations relatives respectives de 21% et de 53% par rapport au témoin.

Lorsqu'une expérience similaire est réalisée à partir de fibroblastes à passage en culture 28, on note une augmentation absolue de 30% de cellules positives pour l'activité β -galactosidase associée à la sénescence (voir figure III-2, verso page III-2); Cela représente une augmentation relative de plus de 300% de cellules positives pour la SA- β -gal chez les cellules soumises à des stress successifs sous t-BHP par rapport à leurs homologues non traitées.

Nous avons vérifié que ces conditions de stress ne sont pas létales pour des fibroblastes. Pour ce faire, un dosage de protéine a été effectué après chaque stress et les résultats (non montrés) confirment qu'il n'y a aucune létalité pour chacun des stress. Cette méthode de dosage des protéines cellulaires, un jour après un stress sous t-BHP a

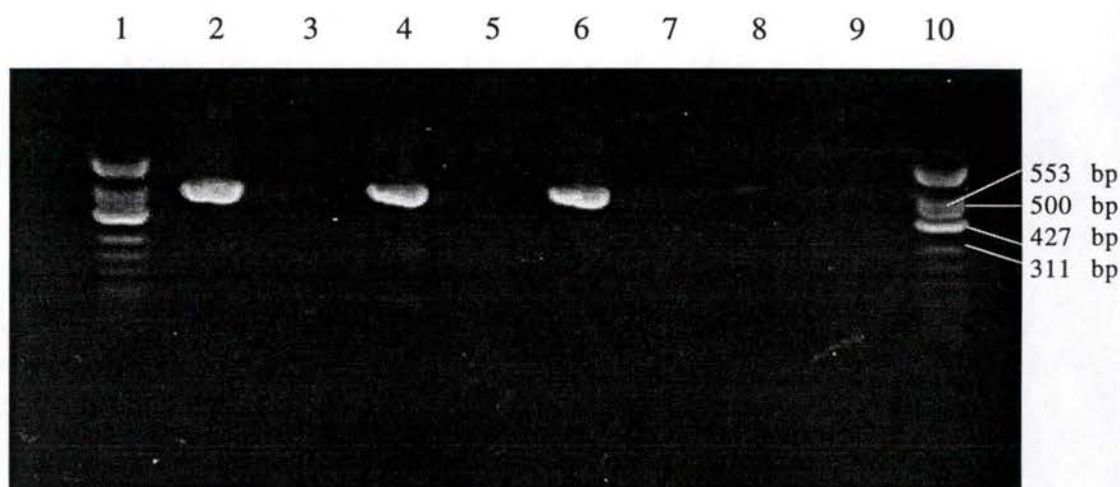


Figure III-3: PCR simplex réalisée sur les extraits des fibroblastes en passage en culture 28.

Pistes 1 et 10: Etalon de poids moléculaire.

Piste 2: Amplification du fragment H1 pour les fibroblastes non stressés.

Piste 3: Amplification du fragment H2 pour les fibroblastes non stressés.

Pistes 4 et 6: Amplification du fragment H1 pour les fibroblastes stressés à 40 μ M de t-BHP.

Pistes 5 et 7: Amplification du fragment H2 pour les fibroblastes stressés à 40 μ M de t-BHP.

Piste 8: Contrôle négatif pour H1.

Piste 9: Contrôle négatif pour H2

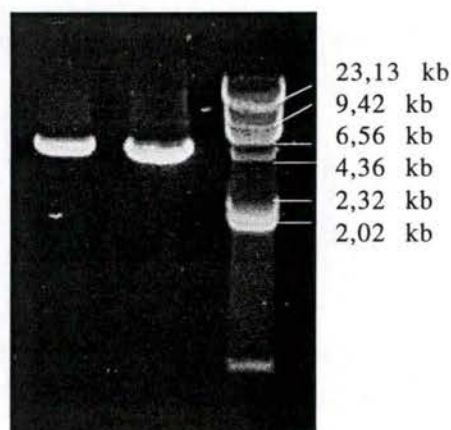


Figure III-4: Amplification du fragment H2 normal, non délété, de 5,4 kb (gel 0,5%).

Pistes 1 et 2: Amplification à partir d'extrait de fibroblastes de passage en culture 36.

Piste 3: Etalon de poids moléculaire.

déjà été comparée précédemment à d'autres méthodes de détermination de viabilité cellulaire et donne des résultats similaires à ceux obtenus par ces méthodes (méthode de dosage d'activité hexoaminidase, méthode de dosage de l'activité de la succinate déhydrogénase mitochondriale utilisant des sels de tétrazolium, comptage des cellules,...). Il est à noter que les fibroblastes résistent très bien à des doses supérieures à 40 μM lors de stress unique mais meurent en grande quantité lorsque des stress successifs sont réalisés à des concentrations supérieures. Par exemple, à 50 et 75 μM en t-BHP, une forte mortalité cellulaire est observée lors du troisième stress.

En conclusion, nous avons opté pour des stress successifs à 40 μM en t-BHP puisque nous obtenions un bon effet sur le vieillissement et pas de mortalité à cette concentration. De plus, le pourcentage de fibroblastes montrant une activité SA- β -galactosidase correspond à celui obtenu dans les expériences où ont été testés les effets de stress au t-BHP sur la prolifération cellulaire, l'expression de p21^{waf-1}, la phosphorylation de pRB et l'expression de l'apolipoprotéine J.

1.1.2) Extraction de l'ADN mitochondrial

Suite à la mise au point des stress sublétaux donnant lieu à un vieillissement prématuré, nous avons extrait l'ADN mitochondrial des cultures de fibroblastes WI-38 non stressés à passages 28, 36 et 48. Cela correspond respectivement à 55, 77 et 95% de la durée de vie proliférative *in vitro* de cette souche de fibroblastes. A partir de cet ADN, nous avons réalisé des PCR simplex pour amplifier un fragment qui n'est retrouvé dans aucune délétion connue de l'ADN mitochondrial et qui est donc toujours présent au sein du génome mitochondrial. Ce fragment est appelé H1 et est long de 533 bp. Une amplification réussie de H1 nous permet de vérifier si la technique d'extraction d'ADN mitochondrial utilisée a bien fonctionné. Nous avons montré que le fragment H1 est bien amplifié lors de PCR simplex (figure III-3, pistes 2, 4 et 6, verso page III-3). Nous avons donc conservé cette méthode d'extraction d'ADN mitochondrial fournie par le Dr. Filser de Zürich.

1.1.3) Mise en évidence de la délétion de 4977 bp

Nous avons ensuite essayé d'amplifier, par PCR simplex, un fragment étant censé rester au sein du génome mitochondrial après délétion. Ce fragment est appelé H2del et est long de 524 bp lorsque le fragment total nommé H2, de 5,4 kb de long, a subi une délétion de

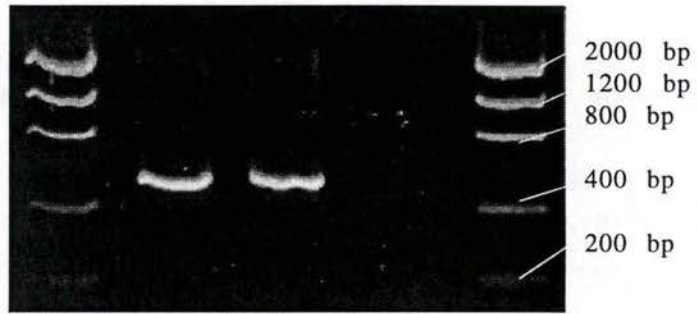


Figure III-5: Amplification du fragment H2del dans l'ADN mitochondrial de CPEO fourni par le Pr. Wei, Taïpei, Chine.

Pistes 1 et 5: Etalon de poids moléculaire.

Piste 2: Amplification du contrôle positif en présence de DMSO.

Piste 3: Amplification du contrôle positif en absence de DMSO.

Piste 4: Contrôle négatif.

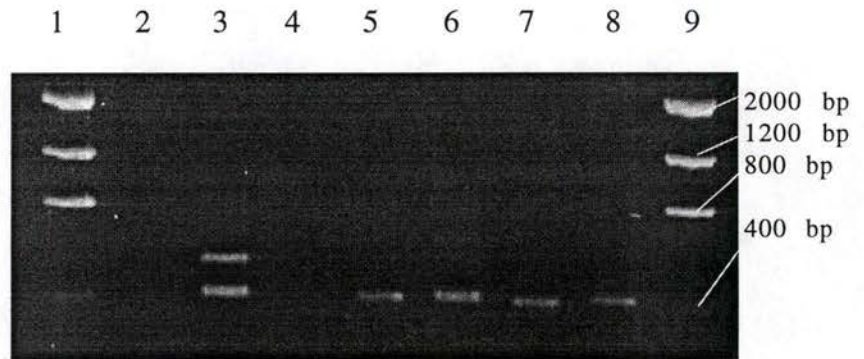


Figure III-6: Nested PCR réalisées sur l'ADN mitochondrial de fibroblastes à passages en culture 28, 36, 48 ayant subi des stress successifs sous t-BHP ou non.

Pistes 1 et 9: Etalons de poids moléculaire.

Piste 2: Fibroblastes à passage en culture 28 non stressés.

Piste 3: Fibroblastes à passage en culture 28 ayant subi 5 stress successifs au t-BHP 40 μ M.

Piste 4: Contrôle négatif.

Piste 5: Fibroblastes à passage en culture 36 non stressés.

Piste 6: Fibroblastes à passage en culture 36 ayant subi 5 stress successifs au t-BHP 20 μ M.

Piste 7: Fibroblastes à passage en culture 36 ayant subi 5 stress successifs au t-BHP 40 μ M.

Piste 8: Fibroblastes à passage en culture 48 non stressés.

4,977 kb. Aucune amplification ne s'est révélée possible dans les conditions de PCR simplex testées (figure III-3 pistes 3,5,7, verso page III-3). A ce stade, plusieurs expériences complémentaires ont été réalisées. Premièrement, on s'est demandé si la méthode d'extraction de l'ADN provoquerait éventuellement une rupture du génome mitochondrial au niveau de H2del et si des structures secondaires de l'ADN (loop, hairpin) pourraient se former et empêcheraient ainsi l'amplification. Nous avons donc tenté, avec succès, d'amplifier le fragment normal, non délété, appelé H2 représentant 5,4 kb (figure III-4, verso page III-3). Nous avons aussi recommencé les PCR simplex de 40 cycles sur H2del en utilisant 1% de DMSO pour rompre d'éventuelles structures secondaires, mais aucune amplification n'a été visible sur gel (non montré).

En conséquence, nous avons cherché un contrôle positif. Celui-ci nous a été fourni par le Professeur Wei de l'Université Yang-Ming, Taïpei, Chine. Il ne s'agit pas d'un extrait provenant d'une personne âgée mais d'un patient atteint de la maladie CPEO qui est une myopathie oculaire incluant une ophthalmoplogie progressive, dont la cause moléculaire est la délétion de 4,977 kb présente dans plus de 70 pourcent des génomes mitochondriaux (communication personnelle du Professeur Wei). Ce contrôle a permis de voir que nos conditions de PCR permettent une amplification du fragment H2del et ce avec ou sans DMSO (figure III-5, verso page III-4).

Etant donné l'impossibilité de mettre en évidence la délétion dans nos échantillons d'ADN mitochondrial de fibroblastes humains par PCR simplex, nous avons réalisé des nested (emboîtées) PCR à partir de 0,5 µg d'extrait des fibroblastes WI-38 (pour les amorces voir annexe). Etant donné la séquence des amorces utilisées les nested PCR doivent donner un amplicon de 404 bp en cas de délétion. Dans ces conditions de PCR nous avons constaté la présence du fragment H2del chez les fibroblastes à passages en culture 32, 36, 48 n'ayant pas été stressés sous t-BHP alors que le fragment H2del n'a pas été détecté chez les fibroblastes à passage en culture 28 (figure III-6 pistes 2, 5, 8, verso page III-4 et figure III-7 pistes 2 et 4, verso page III-5). Tous les échantillons d'ADN mitochondrial provenant de fibroblastes ayant subi des stress successifs ont permis l'amplification de H2del.

Les produits PCR obtenus ont été séquencés puis alignés sur des banques de données pour vérifier la spécificité de nos réactions de PCR (voir annexe).

Nous avons aussi pu observer une autre délétion dans la région couverte par nos amorces internes de nested PCR. Après séquençage, nous avons déterminé l'emplacement exact de la délétion ainsi que sa

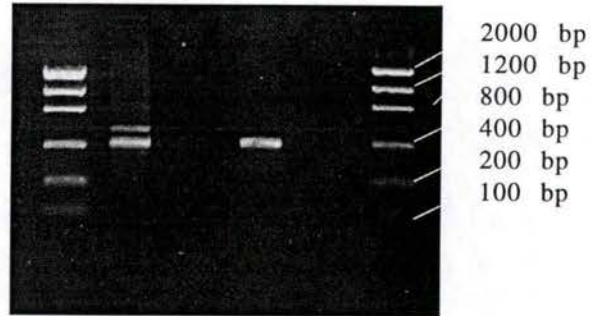


Figure III-7: Nested PCR réalisées sur l'ADN mitochondrial de fibroblastes aux passages en culture 28 et 32.
 Pistes 1 et 6: Etalons de poids moléculaire.
 Piste 2: Fibroblastes à passage en culture 28 ayant subi 5 stress successifs sous 40 μ M de t-BHP.
 Piste 3: Fibroblastes à passage en culture 28 non stressés.
 Piste 4: Fibroblastes à passage en culture 32 non stressés.
 Piste 5: contrôle négatif.

longueur: 4838 bp. Cette bande a été obtenue à chaque répétition de l'expérience, uniquement chez les fibroblastes à passage en culture 28.

Elle est longue de 4,838 kb et sa position sur le génome mitochondrial va de 8272 à 13110 (figure III-8, verso page III-6) tandis que la délétion commune de 4977 pb va de 8482 à 13460. Cette délétion atteint les mêmes 12 gènes que ceux touchés par la délétion de 4977 bp (tableau III-1). De plus, cette délétion de 4,838 kb atteint aussi un gène supplémentaire: le gène K codant pour un ARN de transfert à lysine.

1.2) Quantification de la délétion de 4,977 kb par PCR compétitive

1.2.1) Principe de la PCR compétitive et quantitative utilisée dans ce travail

Pour évaluer le nombre de génomes mitochondriaux présentant la délétion par rapport au nombre total de copies de génomes mitochondriaux, nous avons développé une technique quantitative.

Celle-ci est basée sur la PCR compétitive et a déjà été utilisée sur de l'ADN mitochondrial de rat par Filser *et al.*(1997). Cette méthode est basée sur la compétition entre un standard interne et la séquence à quantifier. Ce standard est amplifié avec la même efficacité que le fragment à doser étant donné son identité de séquence et de taille. La seule différence entre le standard appelé aussi mimique et le fragment sauvage est la présence d'un site de restriction au sein du mimique. Ce site va nous permettre, par restriction, de distinguer la séquence dite sauvage du standard.

On peut donc doser le fragment voulu par rapport à une quantité de standard connue. Pour ce faire, on réalise des PCR simplex radioactives contenant différentes quantités connues de standard par rapport à un volume constant de l'extrait cellulaire à doser.

Le produit de la PCR est ensuite restreint par l'endonucléase spécifique du standard interne. On obtient donc, lors de la migration sur gel de polyacrylamide, trois bandes: deux pour le standard interne qui a été restreint et une autre pour la séquence à doser. Lorsque la somme des deux signaux du standard est d'intensité égale à celui de la séquence à doser nous connaissons le nombre de copies présentant la délétion.

Un premier standard interne, H1, sert à quantifier le nombre total de copies d'ADN mitochondrial, un second standard interne, H2del, permet de quantifier le nombre de copies d'ADN mitochondrial

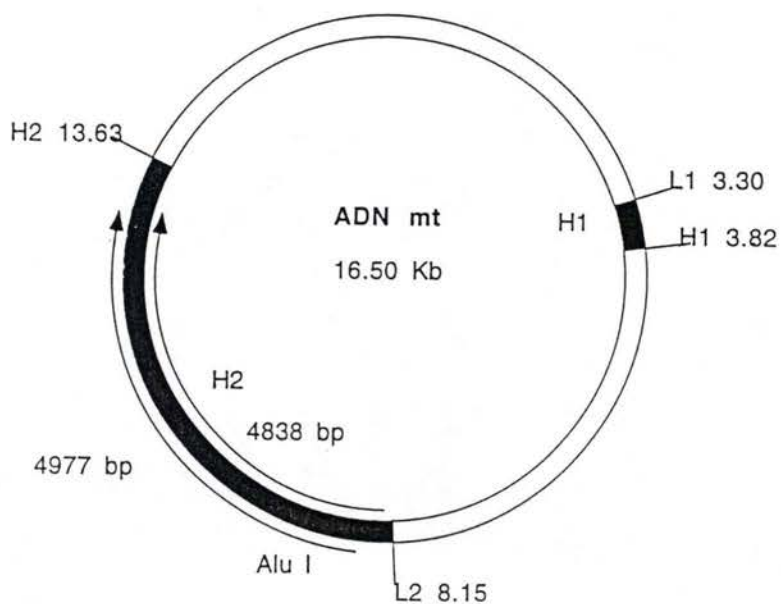


Figure III-8: Représentation du génome mitochondrial.
 On y voit dans les zones ombrées H1 et H2;
 Les positions des amorces y sont aussi indiquées.
 Les flèches en arc de cercle représentent les délétions. L'extérieur
 représente la délétion de 4977 bp tandis que l'intérieur la délétion de 4838 bp.

symbole du gène	positions sur l'ADN mitochondrial	fonction des gènes
ATPase 8	8366-8572	ATP synthase 8
ATPase 6	8527-9207	ATP synthase 6
CO III	9207-9990	Cytochrome c oxydase III
G	9991-10058	ARNt Glycine
ND 3	10059-10404	NADH déshydrogénase 3
R	10405-10469	ARNt Arginine
NDL 4	10470-10766	NADH déshydrogénase 4 L
ND 4	10760-12137	NADH déshydrogénase 4
H	12138-12206	ARNt Histidine
S (AGY)	12207-12265	ARNt Serine 2
L (CUN)	12266-12336	ARNt Leucine 2
ND 5	12337-14148	NADH déshydrogénase 5

Tableau III-1: Gènes délétés totalement ou partiellement par les délétions de 4977 bp et 4838 bp. Notons qu'un gène supplémentaire est délété par la délétion de 4,838 kb. Il s'agit du gène K qui code pour un ARNt à lysine. Les symboles utilisés pour les différents gènes sont ceux utilisés dans la banque de données Mitomap, créée par le Prof. Wallace. Adresse internet: http://www.gen.emory.edu/cgi-bin/mitomap/v3/bin/tbl1_gen.pl

présentant la délétion de 4,977 kb. Le rapport entre les deux nombres de copies obtenues par ces deux PCR compétitives permet de connaître le pourcentage de copies délétées par rapport au nombre total de copies.

1.2.2) Production des standards internes

Nous avons donc besoin de deux standards différents. Le premier possède une séquence identique, à un site de restriction près de H1, H1 est un fragment qui n'a jamais été trouvé comme étant délété dans le génome mitochondrial. H1 nous permettra donc de connaître le nombre total de copies de génome mitochondrial présentes par tube PCR. Pour quantifier le nombre de copies présentant la délétion, nous avons produit un second standard, il s'agit du standard de H2del. H2del est le fragment d'ADN attendu après PCR sur l'ADN mitochondrial présentant la délétion. Connaissant le nombre total de copies et le nombre de copies délétées, on peut établir le pourcentage de délétions au cours du vieillissement.

Pour produire ces deux standards, nous partons de la séquence sauvage et réalisons des PCR à bout flottant (figure III-9) décrites dans le matériels et méthodes. Donc, pour chaque standard, nous obtenons deux fragments de tailles différentes (voir figure III-10A et B, verso page III-7) contenant, à une de leurs extrémités, le nouveau site de restriction orienté de telle manière, qu'après restriction de ces fragments, on puisse les lier sans modifier la séquence sauvage sauf au niveau de ce site de restriction.

Nous avons choisi aussi bien pour le standard de H1 que pour celui de H2del d'ajouter le site Hind III (AAGCTT).

On purifie les deux produits de PCR sur colonne de silice (Boehringer/Mannheim) pour éliminer les amorces.

Le produit de la purification est ensuite restreint par Hind III. Cela permet d'obtenir une extrémité à bout collant anti-complémentaire de celle de l'autre fragment. Ces deux fragments sont ensuite liés et clonés, en même temps, dans le vecteur p GEM® T Easy. Ce vecteur est lui-même, par la suite, introduit dans des bactéries *E. Coli* Sure.

Le vecteur p GEM® T Easy permet la sélection dite blanc-bleu. En principe, lorsqu'elles n'ont pas incorporé d'insert, les bactéries deviennent bleues sur milieu contenant du X-gal alors qu'elles sont blanches si le vecteur contient un insert.

Les colonies blanches sont ensuite mises en culture liquide dans du milieu LB+AMP. On réalise ensuite des minipréparations donnant

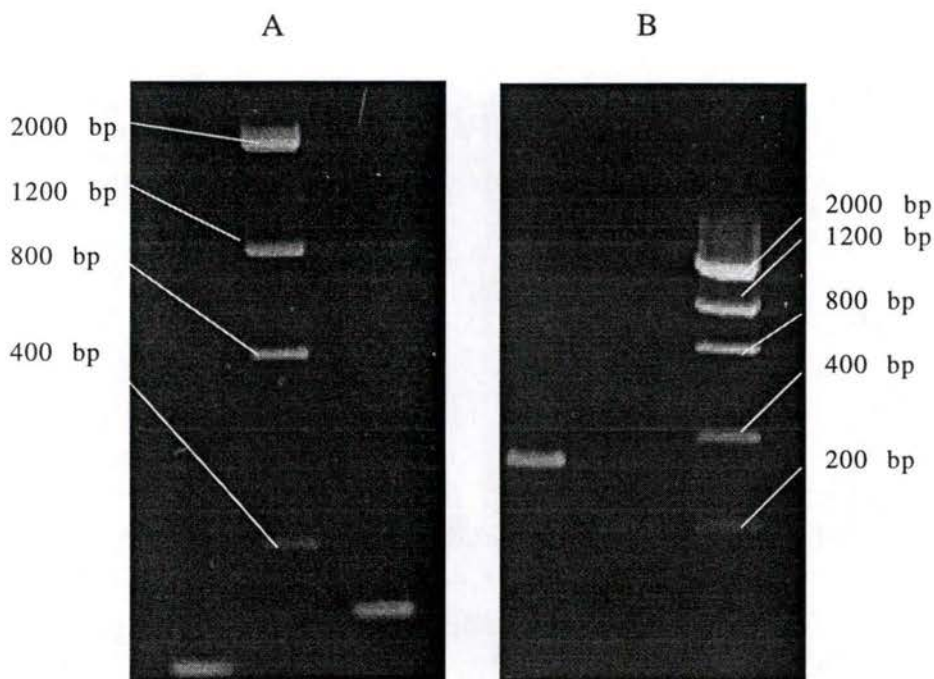


Figure III-10A et B: Production des fragments qui composent les standards.

A: Fragments de H1 avant ligation.

Piste 1: Fragment produit avec les amorces L1 A2 (taille attendue: 237 bp).

Piste 2: Etalon de poids moléculaire.

Piste 3: Fragment produit avec les amorces H1 et B2 (taille attendue: 302 bp).

B: Fragments du mimique de H2 avant ligation.

Piste 1: Fragment produit avec les amorces C1 et L2 (taille attendue: 336 bp).

Piste 2: Fragment produit avec les amorces C2 et H2 (taille attendue: 197 bp).

Piste 3: Etalon de poids moléculaire.

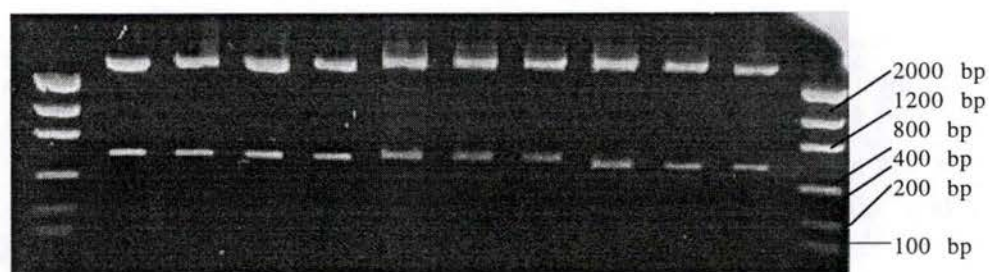


Figure III-11A: Digestion par Eco RI des mêmes colonies blanches obtenues lors du clonage du standard H1 (bandes attendues et observées: 3000, 553 bp).

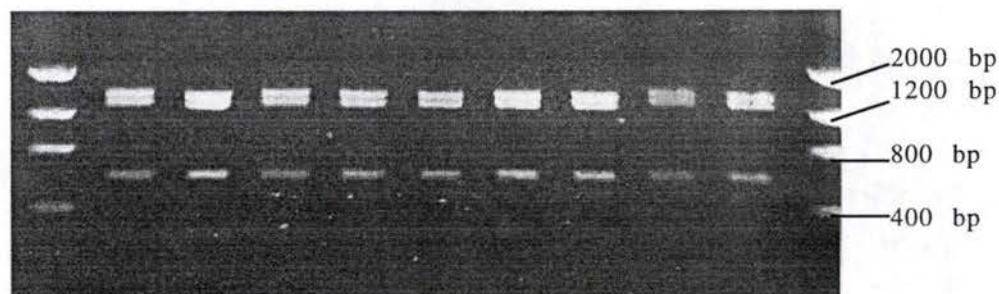


Figure III-11B: Digestion par Bgl I et Pst I des colonies blanches lors du clonage du mimique de H1 (bandes attendues et observées: 1442, 1321, 579, 206 bp).

l'ADN plasmique en suivant le mode opératoire décrit dans le matériels et méthodes.

Connaissant l'ensemble des sites de restriction du vecteur p GEM® T Easy nous avons réalisé des profils de restriction pour vérifier si nos deux produits de PCR ont bien été insérés ensemble dans le vecteur.

Un premier profil est réalisé par l'enzyme Eco RI bordant de part et d'autre le site de clonage (voir figure III-11A, verso page III-7).

Nous avons pu dès lors voir une bande présentant la taille attendue de 533 bp pour le standard de H1 et de 524 bp pour H2. Un autre profil a été réalisé utilisant les enzymes Bgl I et Pst I coupant au sein du plasmide mais aussi de part et d'autre du site de clonage. Cette deuxième restriction nous permet de vérifier la présence de l'insert voulu mais aussi de confirmer que nous sommes bien en présence du plasmide p GEM® T Easy (voir figure III-11B, verso page III-7).

Pour obtenir suffisamment de standard, on réalise ensuite une PCR utilisant les amorces de H1 ou H2del selon le standard à amplifier. Le résultat sur gel de cette PCR confirme que nous sommes bien en présence de nos deux fragments orientés de manière correcte sinon il n'y aurait pas d'amplification (figure III-12A et B, verso page 8). Ce produit est ensuite purifié sur colonne. A partir de la purification, un nouveau profil de restriction est réalisé pour vérifier la présence du site Hind III désiré ce qui est bien le cas (figure III-13, verso page 8).

En guise de dernière vérification, les deux standards sont séquencés (voir annexe). On observe alors une identité de séquences par rapport aux séquences attendues.

En conclusion, nous avons donc obtenu par cette méthode les deux standards internes désirés.

1.2.3) Nombre de cycles de PCR à utiliser lors des PCR compétitives

Afin de réaliser les PCR compétitives, il faut connaître le nombre de copies de standards présentes dans chaque tube PCR. Dès lors, la quantité de standard interne en ng/ml a été déterminée par spectrophotométrie. Connaissant le poids moléculaire des standards internes respectifs de H1 et de H2del, on a déterminé le nombre de copies par ng.

Ensuite, pour permettre une quantification, il faut déterminer le nombre de cycles de PCR de telle sorte que l'on soit toujours en phase ascendante de la réaction et non en phase de saturation.

Nous avons testé 40 et 30 cycles de PCR pour différents nombres de standard (voir figure III-14, verso page 9).

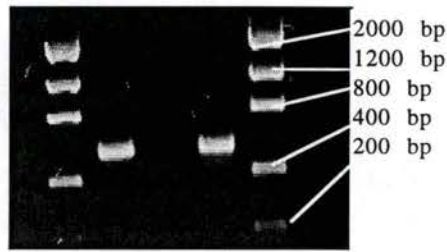


Figure III-12A: PCR de production en quantité du standard de H1(533 bp).

Nous avons ici choisi 2 clones correspondant aux pistes 2 et 4 de la figure III-12.

Pistes 1 et 5: Etalon de poids moléculaire.

Pistes 2 et 4: PCR de production du standard à partir de 2 clones correspondant aux pistes 2 et 4 de la figure III-13A.

Piste 3: Contrôle négatif.

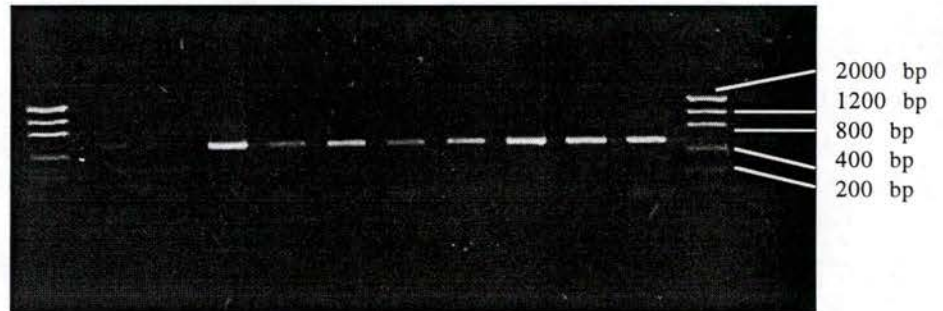


Figure III-12B: PCR de production en quantité du standard H2del.

Pistes 1 et 12: Etalon de poids moléculaire.

Pistes 2 et 3: PCR de production du standard de H2del à partir de clones négatifs.

Pistes 4 à 11: PCR de production du standard de H2del à partir de clones positifs.

Piste 13: Contrôle négatif.

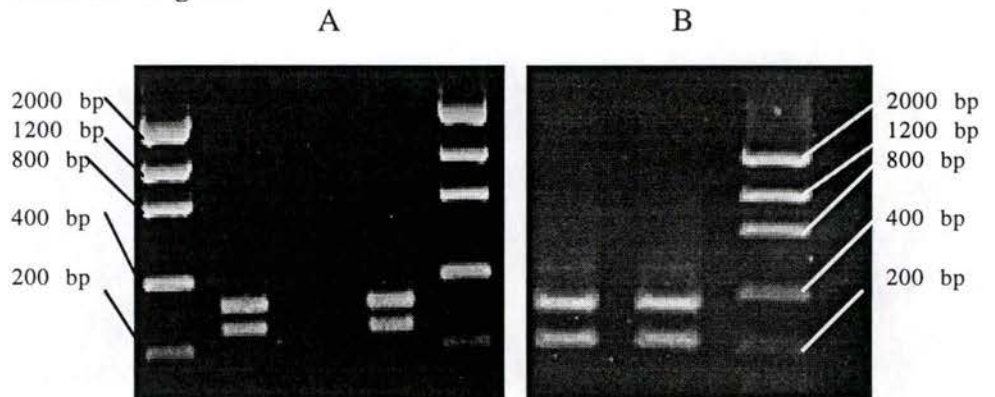


Figure III-13: Digestion du produit PCR du standard de H1 et du standard de H2del par l'endonucléase Hind III.

A: Standard de H1.

Pistes 1 et 5: Etalon de poids moléculaire.

Pistes 2 et 4: Restriction des amplifications vues dans la figure III-14A (tailles attendues et observées: 231 et 296 bp).

B: Standard de H2del (nous avons choisi les clones des pistes 4 et 9 de la figure III-14B).

Pistes 1 et 2: Digestion d'amplicons de la figure III-14B (tailles attendues et observées: 320 et 191 bp).

Piste 3: Etalon de poids moléculaire.

A partir de migrations des amplicons sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium, nous avons remarqué, pour le mimique de H1 que la saturation est atteinte dès 1700 copies à 40 cycles. Il n'était donc pas possible de distinguer la différence entre les signaux à 1700 et $1,7 \cdot 10^9$ copies après 40 cycles. Par contre à 30 cycles, la gradation devient visible de 170 à $1,7 \cdot 10^7$ copies. On a donc choisi de réaliser 30 cycles pour les PCR compétitives avec des dilutions allant de 170 à $1,7 \cdot 10^8$ copies.

1.2.4) Considération des hétéroduplex dans la quantification des signaux

Pour plus de précision, nous avons réalisé des PCR compétitives en présence de [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP et non en bromure d'éthidium comme cela a été le cas dans le travail de Filser *et al.* (1997).

Différents nombres de copies du standard de H1 et H2 ont été testés. Toutefois, le problème de cette technique quantitative est la formation d'hétéroduplex entre les brins du standard et les brins de la séquence sauvage. Ceci est dû à la forte homologie de séquences entre le standard et la séquence sauvage. Suite à cette formation d'hétéroduplex, la digestion par Hind III devient impossible.

D'un autre côté, les homoduplex sauvages ne sont pas non plus digérés par Hind III et forment donc un signal commun avec les hétéroduplex.

A ce niveau, nous avons innové. En effet, lors de la construction des standards, nous avons inséré un site Hind III (AAGCTT). Or, il se fait que le site de restriction Hind III contient le site Alu I. Il en résulte que l'ensemble des homoduplex formés par deux brins sauvages ou deux brins de standards sont digérables par l'endonucléase Alu I. Par contre, suite à la non complémentarité partielle, au niveau du site Hind III, dans un hétéroduplex il y a formation d'une boucle interdisant la digestion par Alu I.

Une première restriction par Hind III permet de distinguer le standard du sauvage. Une seconde digestion par Alu I permet de connaître le pourcentage d'hétéroduplex faussant le signal "sauvage" obtenu lors de la première digestion. On soustrait alors ce pourcentage au signal du fragment sauvage. On peut dès lors comparer sans biais le signal du standard avec celui du fragment à doser.

Pratiquement, par la digestion Alu I, nous obtenons trois signaux. Le signal supérieur correspond aux hétéroduplex, les inférieurs aux homoduplex, les standards et les sauvages. On peut alors, partir de la radioactivité mesurée en coups par minute (CPM) par l'instant imager pour les trois signaux, calculer le pourcentage

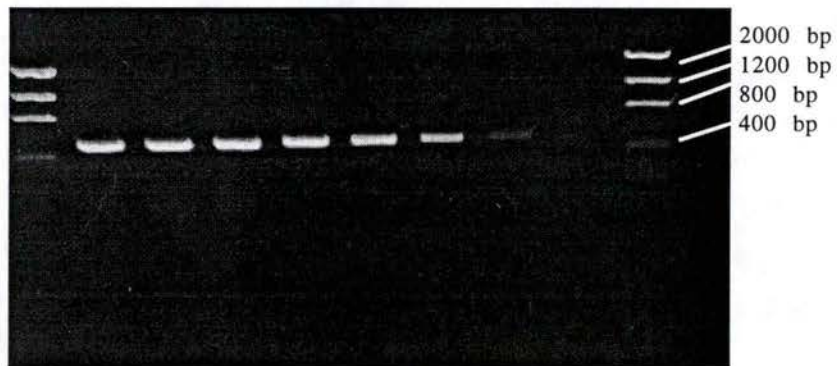
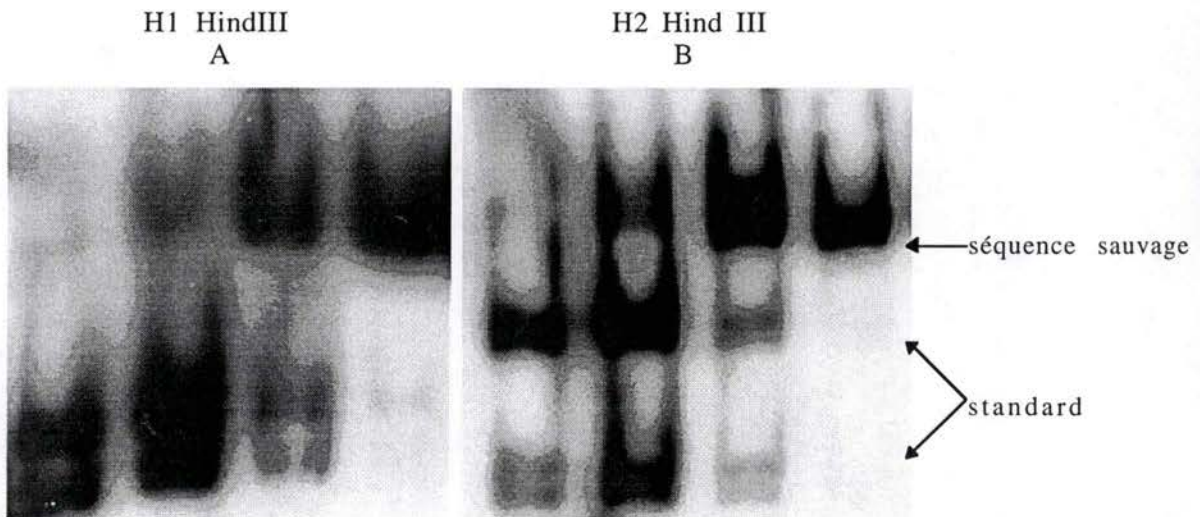


Figure III-14: Réalisation de 30 cycles de PCR pour différents nombres de copies de H1 allant de $1,7 \cdot 10^9$ copies (piste 2) à 170 copies (piste 9).



Figures III-15A et B: PCR compétitives utilisant le standard H1 en A et H2del en B suivies d'une restriction par Hind III.

Pistes 1: $1,7 \cdot 10^9$ copies.

Pistes 2: $1,7 \cdot 10^8$ copies.

Pistes 3: $1,7 \cdot 10^7$ copies.

Pistes 4: $1,7 \cdot 10^6$ copies.

On voit dans les pistes 1 un excès de standard par contre dans les pistes 4 on a un excès de séquences sauvages.

d'hétéroduplex par rapport au nombre total de CPM de l'ensemble des signaux.

Puis on calcule la somme des signaux en CPM de la digestion par Hind III. On calcule ensuite le nombre de CPM de cette somme correspondant aux pourcentages d'hétéroduplex estimés grâce aux sites de restriction Alu I.

Etant donné que les hétéroduplex sont formés dans un rapport 1/1 de brin "sauvage" et de brin "standard", on retire au signal supérieur de la digestion par Hind III visualisé sur gel, correspondant au fragment sauvage, la moitié du nombre de CPM calculé et on additionne l'autre moitié aux signaux du standard.

1.2.5) Dosage des délétions dans le cas de la maladie CPEO

Etant donné la grande rareté de la délétion de 4977 bp pour les fibroblastes de poumon humain en culture aussi bien dans le cas du vieillissement normal qu'accélééré par des stress, il apparaît utopique de doser cette délétion par la méthode de PCR compétitive. C'est pourquoi nous avons mis au point cette technique sur l'échantillon d'ADN mitochondrial provenant d'un individu atteint de la CPEO et fourni par le Professeur Wei, Taïpei, Chine.

La figure III-15A et B (verso page III-9) présentent les résultats obtenus après digestion par Hind III des amplicons issus de la PCR compétitive utilisant les standards H1 (figure III-15A) et H2del (figure III-15B). De $1,7 \cdot 10^9$ copies à $1,7 \cdot 10^6$ copies de standards ont été utilisées (pistes 1 à 4). Aux nombres de copies du standard de $1,7 \cdot 10^9$ (piste 1 sur figure III-15) et de $1,7 \cdot 10^6$ copies (piste 4 sur fig III-15), on voit respectivement un excès de brins "standards" et de brins "sauvages". Nous avons considéré les résultats obtenus à $1,7 \cdot 10^8$ et $1,7 \cdot 10^7$ copies.

Les figures III-16A et B (verso page III-10) montrent les produits de digestion par Alu I des amplicons obtenus respectivement aux figures III-15A et B après des PCR compétitives réalisées à partir de $1,7 \cdot 10^7$ copies de standards de H1 (figure III-16A) et H2del (figure III-16B).

A partir du standard H1, on trouve, après mesure des CPM respectifs, 18109 CPM d'homoduplex et 5445 CPM d'hétéroduplex, soit 23,1% d'hétéroduplex par rapport au nombre de CPM total.

A partir du standard H2del, on trouve, après mesure des CPM respectifs, 1339 CPM d'homoduplex et 551 CPM d'hétéroduplex, soit 29,0% d'hétéroduplex par rapport au nombre de CPM total (tableau III-2, verso page III-11).

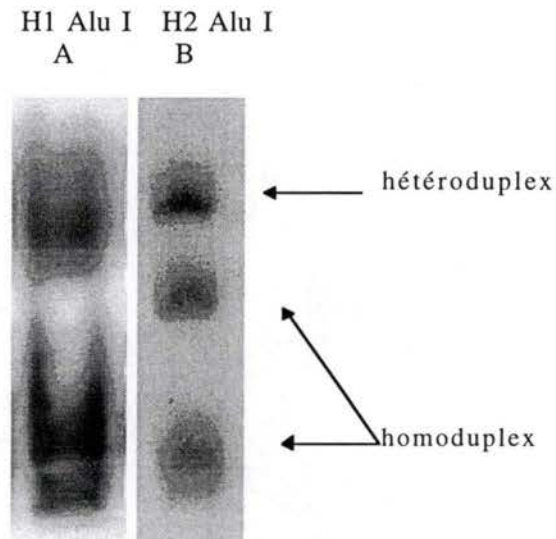


Figure III-16A et B: Produits de digestion par Alu I des amplicons des PCR compétitives présentées aux figures III-15A et B et réalisées avec un nombre de copies des standards H1(A) ou H2del (B) égal à $1,7 \cdot 10^7$ copies. Les positions respectives des homoduplex et hétéroduplex sont renseignées par des flèches.

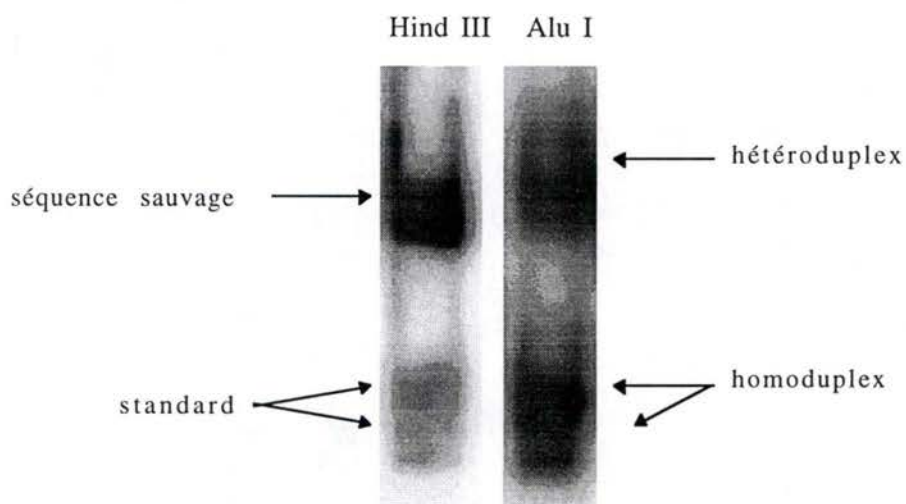


Figure III-17: Test de validation de la PCR compétitive.

On a mis approximativement le même nombre de copies du brin sauvage H1 et du mimique de celui-ci.

Pour une PCR compétitive réalisée en présence du même nombre de copies du standard interne de H1 et du fragment sauvage H1, appelée test, nous obtenons 36% d'hétéroduplex (voir figure III-17, verso page 10). Toutefois, pour affirmer ceci, il faut être sûr que l'endonucléase Alu I ne coupe en aucun cas les hétéroduplex.

C'est pourquoi nous avons dénaturé pendant 15 minutes à 100°C un même nombre de copies de H1 et du standard de H1. On a par la suite laissé refroidir lentement une nuit pour favoriser l'hybridation. On obtient alors en théorie 50% d'hétéroduplex. Dès lors, la bande des hétéroduplex doit, après digestion par Alu I, représenter 50% du signal total obtenu ce qui est effectivement constaté sur la figure III-18 (dos de la page III-11).

Dans la partie b du tableau III-2 (verso page III-11), on calcule le nombre de CPM réels correspondant aux brins "standards" et aux brins "sauvages". Pour ce faire, et comme expliqué plus haut, on retire la moitié du pourcentage d'hétéroduplex du nombre de CPM mesurés pour le sauvage, et on ajoute la moitié de ce même pourcentage au nombre de CPM mesurés, pour le standard. On a ensuite exprimé en pourcent le rapport entre les CPM réels "sauvage"/"standard", avant de calculer le nombre de copies des sauvages de départ.

D'après nos résultats, si l'on divise le nombre total de copies obtenues ($1,54 \cdot 10^7$) par le nombre de génome délétés obtenus ($1,5 \cdot 10^7$), on obtient 97,3% de séquences délétées par rapport au nombre de copies total. Cette valeur est supérieure à celles obtenues par le Professeur Wei mais n'est pas éloignée de la réalité si l'on se réfère au cas de la neuropathie de Leber (LHON). En effet, pour cette maladie voisine de la CPEO, des taux de mutations proches de l'homoplasie (> 95%) sont nécessaires pour voir apparaître les symptômes de la maladie. Cependant ce dernier résultat doit être pris avec précaution car l'échantillon fourni par le Prof. Wei ne contenait que très peu d'ADN et ne nous a pas permis d'affiner nos dilutions de standards.

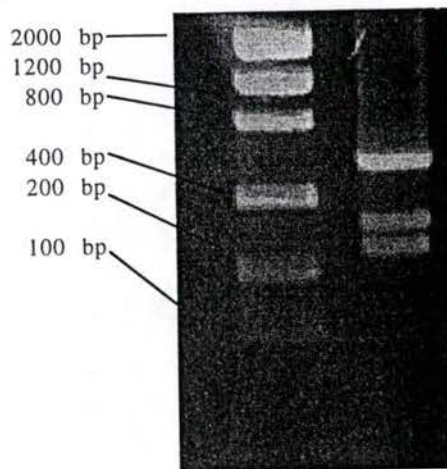


Figure III-18: Vérification de l'efficacité de l'enzyme Alu I. Un même nombre de copies de la séquence sauvage H1 et de son mimique ont été dénaturés ensemble 10 minutes à 100°C puis laissés renaturer lentement une nuit. Nous obtenons alors statistiquement 50% d'hétéroduplex que l'enzyme Alu I ne peut digérer. Le signal des hétéroduplex doit donc représenter 50% de la somme des signaux ce qui est constaté ici.
Piste 1: Marqueur de poids moléculaire.
Piste 2: Digestion par l'endonucléase Alu I du produit de renaturation.

	nombre de copies de standard	CPM homoduplex	CPM hétéroduplex	% hétéroduplex par rapport au CPM total
H1	1,7 10 ⁷	18109,00	5445,00	23,10
H2 del	1,7 10 ⁷	1339,00	551,00	29,00
Test	1/1	7236,00	4103,00	36,00

	nombre de copies de standard	CPM apparents du standard	CPM apparents du fragment sauvage	CPM réel standard	CPM réel sauvage	équivalence = rapport des CPM réels en %	Calcul du nombre de copies
H1	1,7 10 ⁷	5443,00	7847,00	6971,90	6312,00	90,5	1,54 10 ⁷
H2 del	1,7 10 ⁷	2118,00	3357,00	2911,00	2563,20	88,5	1,50 10 ⁷
Test	1/1	3040,00	6505,00	4758,10	4786,90	100,6	-

Tableau III-2A et B: Tableau donnant les valeurs obtenues pour 1,7 10⁷ de copies de standard H1 et H2del.
A: Evaluation du pourcentage d'hétéroduplex.
B: Colonne 1: Standards utilisés
Colonnes 3 et 4: CPM mesurés par instant imager.
Colonnes 5 et 6: CPM mesurés, corrigé en tenant compte du % d'hétéroduplex.
Colonne 7: Equivalence entre le signal corrigé du standard et le signal corrigé (voir le texte pour le mode de calcul) du fragment à doser.
Colonne 9: Nombre de copies calculé par rapport au % d'équivalence.
Dernière ligne: Test de validation de la technique: on a réalisé une PCR compétitive avec un même nombre de copies de standard de H1 que de copies sauvage H1.

2) Variation du taux de transcription de gènes spécifiques du vieillissement normal lors du vieillissement accéléré par des stress oxydatifs

Les fibroblastes en culture comme *in vivo* acquièrent différents biomarqueurs spécifiques, lors de leur vieillissement. Par exemple, On note une augmentation des morphotypes postmitotiques, une augmentation de la proportion de cellules positives pour l'activité β -galactosidase associée à la sénescence mais aussi une diminution drastique et irréversible de la prolifération cellulaire. Dans l'introduction, nous avons bien vu que ces modifications sont aussi observées dans les fibroblastes en culture soumis à des doses sublétales de t-BHP ou d' H_2O_2 .

Sur base de ces observations, on peut donc poser l'hypothèse que les stress oxydatifs sublétaux induisent un vieillissement accéléré conduisant à un état proche du vieillissement normal. Toutefois, aucune preuve moléculaire ne venait étayer cette hypothèse jusqu'à ce travail.

Dans ce travail, nous avons comparé le niveau de transcription de plusieurs gènes lors du vieillissement normal et du vieillissement accéléré sous stress à l' H_2O_2 ou au t-BHP.

Le choix des gènes est issu d'une collaboration avec le Dr. E.S. Gonos, d'Athènes, Grèce. Cette équipe étudie le vieillissement cellulaire à partir de lignée tsa conditionnellement immortalisées. Les lignées tsa sont des fibroblastes embryonnaires de rats qui ont été immortalisés par un antigène T du virus SV-40 thermosensible. Ces cellules croissent indéfiniment à la température, dite permissive, de 33°C. Lorsque la température de la culture est portée à 39°C, l'antigène T est dénaturé et les cellules subissent, après 72 heures de ce traitement, une perte irréversible de leur phénotype immortel. Elles arrêtent de se diviser de manière définitive et acquièrent une morphologie de type âgée. Gonos *et al.* ont mis en évidence une série de gènes différentiellement exprimés chez des cellules tsa ayant subi un arrêt définitif de la croissance par rapport aux cellules immortelles. Ces gènes sont la fibronectine, l'ostéonectine, l' α 1 (I)-procollagène, l'apolipoprotéine J, la sous-unité quatre de la cytochrome C oxydase, une protéine homologue d'une sous-unité α de protéine liant le GTP, SM 22 (Smooth Muscle) et SS 9.

2.1) Effet des stress à l' H_2O_2

Pour étudier le niveau de transcription de ces gènes chez les cellules jeunes, vieilles ou jeunes ayant subi des stress oxydatifs sous $450 \mu\text{M}$ d' H_2O_2 ou sous t-BHP, l'ARN total de quatre populations fibroblastiques a été extrait.

Population 1: Fibroblastes IMR-90 jeunes, donc à faible nombre de passages en culture.

Population 2: Fibroblastes IMR-90 âgés, donc à nombre élevé de passages en culture (53) représentant plus de 95% de la durée de vie proliférative de ces cellules.

Population 3: Fibroblastes IMR-90 jeunes ayant subi à confluence, 72 heures avant l'extraction d'ARN, un stress sous $450 \mu\text{M}$ d' H_2O_2 .

Population 4: Fibroblastes IMR-90 jeunes ayant subi, à demi-confluence, et 72 heures avant l'extraction d'ARN, un stress sous $450 \mu\text{M}$ d' H_2O_2 . Pratiquement, 48 heures avant le stress les cellules sont repiquées à dilution 1/4.

L'ARN a été extrait des populations à deux états de confluence pour déterminer l'effet éventuel de l'inhibition de contact et donc de l'inhibition des mitoses due à la confluence des cellules, sur le niveau de transcription des gènes étudiés.

Nous avons aussi étudié l'effet d'un autre type de stress oxydatif, en utilisant une autre souche de fibroblastes, les fibroblastes WI-38, sur le niveau de transcription. Pour ce faire, l'ARN total de trois populations de fibroblastes WI-38 a été extrait.

Population 1: Fibroblastes WI-38 jeunes.

Population 2: Fibroblastes WI-38 âgés.

Population 3: Fibroblastes WI-38 jeunes ayant subi, à confluence, cinq stress successifs sous tert-butylhydroperoxyde $40 \mu\text{M}$ (t-BHP), à raison d'un stress par jour pendant cinq jours. L'ARN a été extrait 72 heures après le dernier stress.

Les détails pratiques de ces manipulations sont décrits dans les matériels et méthodes. Ces extractions d'ARN ont été réalisées 72 heures après le stress unique sous H_2O_2 et 72 heures après le dernier stress sous t-BHP, de manière à étudier les effets à long terme des





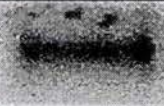








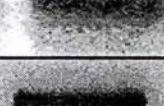
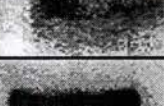


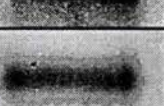


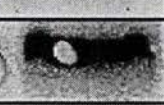



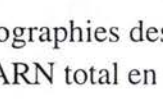
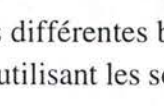
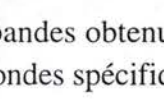
	cellules jeunes	cellules jeunes + 1 stress H ₂ O ₂	cellules âgées
GTP binding protein- α			
SM22			
Fibronectine			
SS9			
Apolipoprotéine J			
α 1(I)-procollagène			
sous-unité 4 de la cytochrome c oxydase			
Osteonectin			
ARN 18S			

Figure III-19 : Autoradiographies des différentes bandes obtenues par northern blot à partir de 20 μ g d'ARN total en utilisant les sondes spécifiques de ces gènes.

stress sur la transcription des gènes d'intérêt. En effet, cette étude se distingue de tous les autres travaux sur l'effet des stress, où l'on étudie en général la réponse au stress pendant, juste après, ou quelques heures après le stress. Pour pouvoir dire que les cellules ayant subi des stress sublétaux ont le phénotype des cellules âgées, il faut que les niveaux de transcription observés ne correspondent pas à la réponse immédiate au stress mais bien à une transcription présente à long terme après les stress.

Pour chaque piste de gel d'agarose, 20 µg d'ARN ont été utilisés. L'ARN a ensuite été transféré sur une membrane de nylon. Ces membranes ont ensuite été préhybridées pendant 5 heures à 42°C puis hybridées avec des sondes marquées radioactivement pendant 20 heures.

Après l'hybridation, plusieurs lavages sont réalisés. Ils permettent d'éliminer le bruit de fond généré par des hybridations non spécifiques. Les bandes correspondant à une hybridation spécifique sont visualisées et quantifiées à l'aide d'un « Instant Imager ».

On utilise une sonde ARN 18 S comme standard, l'ARN 18 S étant connu comme étant exprimé de manière constante au cours du vieillissement cellulaire *in vitro*. L'utilisation de cette sonde de contrôle permet de vérifier que, au départ, une quantité égale d'ARN total a été déposée dans chaque puit du gel. La quantification du signal obtenue pour l'ARN 18S permet également une normalisation des quantifications obtenues pour l'ARNm d'intérêt.

Nous observons dès lors une surexpression des ARNm testés aussi bien chez les fibroblastes âgés que chez les fibroblastes ayant subi un stress sublétal avec de l' H_2O_2 , 72 heures avant extraction des ARN totaux. Ces études ont été menées sur des fibroblastes de souche IMR-90.

Lors des quantifications, le niveau de base d'expression (100%) est considéré comme étant celui des cellules jeunes non stressées.

Si l'on prend les gènes un à un, pour la fibronectine on constate un passage de 100% à 540% et 690% (figure III-19 et III-20, verso page III-13 et III-15, tableau III-3, verso page III-14) respectivement pour les fibroblastes jeunes ayant subi un stress à 450 µM d' H_2O_2 et les cellules âgées (génération en culture 53).

Dans le cas de l'ostéonectine, l'augmentation est moins spectaculaire, on passe de 100% à 230% et 250% pour respectivement les fibroblastes stressés et les fibroblastes âgés, montrant une fois de plus une similitude entre le vieillissement normal et l'effet des stress sublétaux à l' H_2O_2 .

cellules non confluentes lors des stress
et de l'extraction

cellules confluentes lors des stress et de
l'extraction

	cellules jeunes	cellules jeunes +stress	cellules âgées		cellules jeunes	cellules jeunes +stress	cellules âgées
Apolipoprotein J	100	290	350		100	220	370
Fibronectine	100	540	690		100	230	220
SM22	100	190	260		100	210	230
SS9	100	270	300		100	90	120
α 1(I)procollagène	100	250	300		100	60	80
Ostéonectine	100	230	240		100	250	290
GTP- α binding protein	100	210	230		100	137	113
cytochrome C oxidase	100	138	261		-	-	-

Tableau III-3 : Résultats des northern blots réalisés.

Les coups par minute sont calculés en pour cents par rapport aux cellules jeunes non stressées. Elles représentent donc la valeur 100%.

Les trois premières colonnes de pourcentages donnent les résultats obtenus lorsque le stress est réalisé sur des cellules non confluentes, les trois dernière colonnes sont obtenues à partir des cellules confluentes.

Les variations de l'expression considérées comme significatives sont notées en caractères gras.

Lors du passage de 100% à 250% et 300%, du niveau d'expression de l'ARNm l' α 1(I) procollagène, respectivement pour les fibroblastes jeunes ayant subi le stress à l' H_2O_2 et les cellules âgées, une telle similitude est aussi visible.

Pour les autres gènes étudiés en l'occurrence SM 22, SS 9, l'apolipoprotéine J, GTP- α binding protéine et la sous-unité quatre de la cytochrome c oxydase, des constatations identiques sont à retenir. Les variations respectives de transcription sont reprises dans le tableau III-3 au verso de la page III-14.

Il faut malgré tout s'intéresser plus particulièrement à la sous-unité quatre de la cytochrome c oxydase où l'on passe de la transcription basale (100%) chez les cellules jeunes à 138% pour les fibroblastes stressés à l' H_2O_2 et 261% pour les fibroblastes âgés de passage en culture 53. Ceci nous montre qu'apparemment, la cytochrome oxydase ne subit pas de modification suite aux stress car la différence de 38% ne peut être retenue comme significative. Donc, pour cet ARNm, on note une surexpression uniquement chez les cellules âgées et pas chez les cellules soumises à un stress sous H_2O_2 . Cela constitue une exception par rapport aux résultats précédents.

Ces résultats ont été obtenus pour les fibroblastes IMR-90 non confluents. Si, cette fois, on observe les résultats issus des expériences sur les fibroblastes confluents (voir tableau III-3, verso page III-14) réalisées dans les mêmes conditions, des constatations similaires sont faites pour la fibronectine, l'apolipoprotéine J, SM 22 et l'ostéonectine. On constate en effet, une surexpression de l'ARNm de ces gènes à la fois chez les cellules jeunes ayant subi un stress sous H_2O_2 et chez les cellules normalement âgées. Par contre, pour SS 9, l' α 1 (I) procollagène et la GTP- α binding protein, on ne trouve plus aucune surexpression chez les cellules où l'ARN total a été extrait à partir de cultures confluentes. Dans le cas de la fibronectine, la différence est beaucoup moins marquée.

En parallèle, des expériences du même type ont été menées en utilisant des fibroblastes de poumon toujours, mais de souche WI-38. On a étudié l'expression de ces mêmes gènes mais avec des fibroblastes stressés 5 fois à 40 μ M de t-BHP. Un seul de ces gènes a pu être testé pour des raisons de temps, il s'agit de l'apolipoprotéine J (résultat non montré) qui présente également dans ce cas une augmentation de sa transcription suite à l'âge mais aussi suite aux stress. Les stress au t-BHP et à l' H_2O_2 semblent donc avoir des effets proches.

Pour la fibronectine, deux ARNm sont détectés lors des hybridations. Tous deux sont surexprimés au cours du vieillissement mais à des taux différents. Ce n'est pas surprenant, puisque le gène

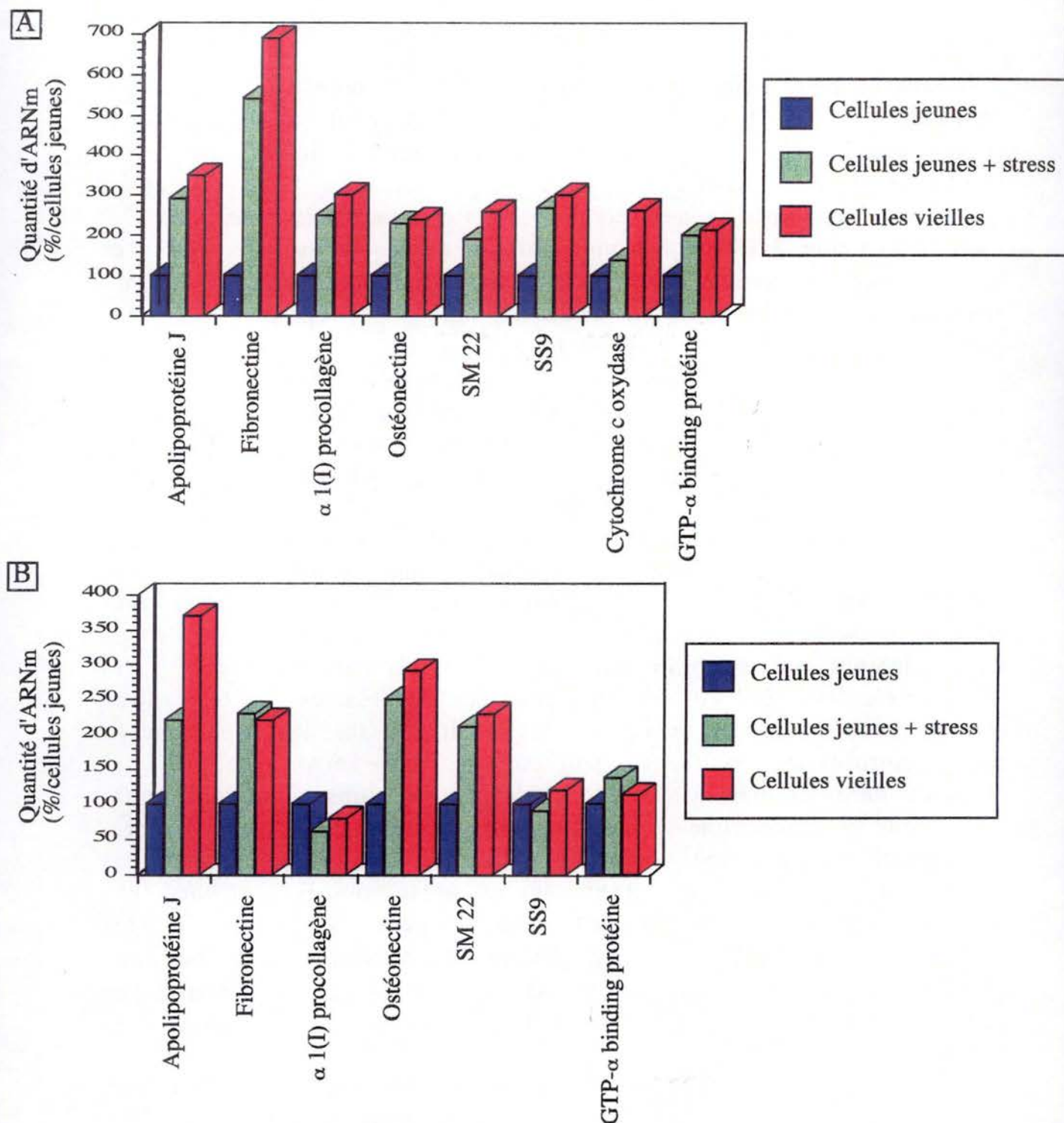


Figure III-20: Variation des quantités d'ARN correspondant aux différents gènes étudiés en pourcent par rapport aux cellules jeunes

A: Cultures non confluentes

Fibroblastes jeunes (à passage en culture 21)

Fibroblastes jeunes (à passage en culture 21) ayant subi un stress à l' H_2O_2

Fibroblastes âgés (à passage en culture 53)

B: Cultures confluentes

Fibroblastes jeunes (à passage en culture 21)

Fibroblastes jeunes (à passage en culture 21) ayant subi un stress à l' H_2O_2

Fibroblastes âgés (à passage en culture 53)

par transcription donne des transcrits immatures du gène codant pour la fibronectine qui sont modifiés par épissage alternatif donnant différents transcrits de tailles différentes (Magnuson, V.L. *et al.*, 1991). Pour confirmer cette observation, nous allons, dans un futur proche, séquencer les sondes reçues par le Pr. Gonos pour savoir à quels transcrits correspondent les ARN détectés.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, ces similitudes supplémentaires entre le vieillissement normal *in vitro* et l'effet à long terme de stress oxydatifs sublétaux supportent l'hypothèse d'un mécanisme commun, au moins en partie, entre ces deux comportements cellulaires.

Plusieurs voies d'études sont possibles. Des mécanismes potentiels seront discutés dans la conclusion générale.

Quel pourrait-être ce mécanisme commun entre la sénescence répllicative et les effets à long terme des stress oxydatifs?

Premièrement, nous avons vu dans l'introduction que les cellules sénescents surexpriment des protéines bloquant le cycle cellulaire, comme p21^{waf-1}, ou connaissent des modifications du niveau de phosphorylation de certaines protéines, comme pRB qui devient hypophosphorylée (Campisi, J. *et al.*, 1996). D'autre part, on sait que les cellules sénescents connaissent, selon le type cellulaire, soit une modification du niveau d'expression, soit une modification de l'activité de liaison à l'ADN de p53, participant ainsi aussi au blocage irréversible des mitoses.

D'autre part, nous savons que pRB est hypophosphorylé, séquestrant alors le facteur de transcription E2F, et que p21^{waf-1} est surexprimée pendant une période s'étalant sur au moins 5 jours après le dernier stress sous t-BHP et au moins 3 semaines après un stress sous H₂O₂ (Dumont *et al.*, en préparation, Q. Chen, communication personnelle).

Pourquoi nous intéresser à p53, p21, et pRB?

La consultation des banques de données montre que la transcription de la plupart des gènes étudiés dans ce travail, dépend soit de la présence de pRB phosphorylé ou non, soit encore de la présence de p53.

La région carboxyterminale de p53 favorise la liaison de p53 à l'extrémité des molécules d'ADN et l'hybridation subséquente d'oligonucléotides complémentaires, ceci pouvant faire partie du mécanisme de reconnaissance des dommages à l'ADN, dont les dommages oxydatifs, par p53 (Picksley et Lane, 1994).

L'inactivation de p53 par le produit du gène E6 pourrait remettre en cause la liaison de p53 avec l'ADN endommagé, ou avec d'autres protéines intervenant dans la réponse aux dommages à l'ADN comme la poly (ADP-ribose) polymérase, empêchant ainsi la réponse cellulaire à court et à long terme sur l'expression génique, à conditions que les cellules restent en vie. De telles expériences seraient envisageables surtout lors des stress sous t-BHP, qui est moins réactionnel que l'H₂O₂,

et permettraient peut-être une meilleure survie des cellules malgré de moindre dommages à l'ADN.

De plus, les facteurs de transcription de la famille E2F, dont E2F1 coopèrent avec p53 pour médier des changements de comportement cellulaire, dont l'apoptose dans certains types cellulaire (Pour une revue:(Picksley et Lane, 1994))? Aucune étude n'ayant jamais été réalisée lors du vieillissement accéléré de fibroblastes.

Des fibroblastes transfectés par le gène E6 ne synthétisent plus la protéine p21^{waf-1} lorsque ces cellules sont traitées avec de mitomycine C, une molécule anti-tumorale qui pontre les doubles brins d'ADN par réaction radicalaire. Un vieillissement prématuré des cellules est observé. Ces expériences montrent le rôle de p53 dans le vieillissement prématuré, où p21^{waf-1} est synthétisé lors des stress radicalaires sublétaux par liaison de ce facteur de transcription p53 au promoteur de p21^{waf-1} (pour une revue (Gichrest et Bohr, 1997)).

Le rôle de pRB dans la régulation de la transcription est complexe, son niveau de phosphorylation n'étant pas le seul paramètre intervenant. Par exemple, Zwicker et al. (1996) ont montré dans Science que la liaison du facteur de transcription E2F au promoteur du gène *B-myb* utilisé comme modèle de différenciation se fait, que E2F soit lié à pRB ou non. Par contre la présence de pRB avait un rôle dans l'activation de la transcription (Zwicker, J. *et al.*, 1996) de *B-myb* par E2F, peut-être par des modifications soit de la structure du complexe nucléoprotéique formé par l'ADN, E2F et pRB, soit par une phosphorylation de E2F par des kinases dépendantes de la présence de cyclines, non encore identifiées.

Ceci nous amène à faire l'hypothèse d'une explication qui changerait totalement la manière de considérer la sénescence répliative *in vitro* non plus comme un processus de vieillissement mais plutôt comme le résultat d'un processus de différenciation cellulaire. En effet, la protéine pRB peut à la fois inhiber le cycle cellulaire, mais aussi promouvoir la différenciation. D'une part, on a expliqué, dans l'introduction, que la protéine pRB doit être phosphorylée pour libérer E2F et permettre la transcription de gènes permettant de passer de G1 à S dans le cycle cellulaire. Mais d'autre part, Sellers *et al.*, cette année, ont montré que la séquestration de E2F ou sa libération par pRB n'ont rien à voir avec le contrôle de la différenciation par pRB. ces auteurs ont transfecté différentes constructions de pRB, ne permettant pas la formation d'une poche de forme normale (on parle de pocket-proteins) dans la structure tridimensionnelle de pRB, et donc ne permettant pas la liaison de E2F. Malgré leur incapacité à lier E2F, tous les mutants de pRB testés par

Sellers *et al.* en 1998, continuent de provoquer la différenciation cellulaire tout en bloquant la mitose.

Selon ces résultats, le concept selon lequel pRB agit toujours en séquestrant, ou non, E2F, est dépassé (Sellers, W.R. *et al.*, 1998).

De plus, les travaux de G. Dimri, au laboratoire de J. Campisi à Berkeley, montrent que, dans des fibroblastes humains ne possédant plus le gène de pRB fonctionnel, on observe tout de même une inhibition de mitose lorsque la protéine p21^{waf-1} est exprimée. p21^{waf-1} supprime l'activité de promoteurs répondant à E2F (dihydrofolate réductase, cdc 2) en l'absence de pRB fonctionnel, montrant ainsi que pRB n'est même pas essentiel à l'inhibition de la croissance bien qu'y participant en conditions normales, lorsqu'il est présent. De plus, l'addition de p21^{waf-1} à des extraits cellulaires sépare les constituants E2F-Cdk2 formant un complexe se liant à l'ADN de cellules capables de prolifération (Dimri, G.P. *et al.*, 1996).

De tous ces travaux, on peut conclure que pRB d'une part peut empêcher l'expression de gènes nécessaires à la transition G1/S dans le cycle cellulaire, bien que p21^{waf-1} soit aussi capable de le faire, ce qui est intéressant en situation de stress touchant l'ADN, activant p53 et donc la synthèse de p21^{waf-1}. D'autre part, une autre fonction de pRB, indépendante de la première, serait de favoriser la différenciation cellulaire.

Considérons ces données par rapport à nos travaux. D'une part, p21^{waf-1} est présente pendant au moins 5 jours après des stress successifs sous t-BHP et au moins 21 jours après un stress subléta à l'H₂O₂ et contribue donc à l'arrêt de la prolifération, tout comme pRB qui est hypophosphorylée et empêche l'activation, par E2F, de gènes liés à la transition G1/S.

D'autre part, si la sénescence répllicative est un processus proche d'une différenciation, et si ce processus peut être accéléré par les stress sublétaux, cela pourrait vouloir dire que pRB intervient alors dans ce processus de différenciation. Cela renforce l'attrait d'expériences durant lesquelles des fibroblastes transfectés par le gène virale E7, dont le produit inactive pRB, seraient exposés à des stress sublétaux. Le but de tels expériences serait de connaître le niveau de transcription des gènes étudiés dans ce travail comme la fibronectine, SS 9, SM 22, etc.

Si c'est le cas, il faudrait pouvoir expliquer comment des stress non radicalaires, comme l'éthanol qui modifie la fluidité de membranes et les courants ioniques sans générer de radicaux libres, chez les fibroblastes, ou le sorbitol qui réalise un choc osmotique, ainsi que d'autres conditions non radicalaires (Pour une revue (Toussaint, O. *et al.*, 1998)) peuvent aussi accélérer ce processus. Peut-être que ces stress

agissent aussi sur pRB ? Ou sur d'autres protéines jouant un rôle dans le processus de différenciation?

En conclusion, il s'avèrerait donc très informatif de savoir si les gènes étudiés dans ce travail sont toujours transcrits à un même niveau chez les cellules dont les protéines p53 et/ou pRB sont inactivées après transfection, par méthode rétrovirale, des gènes E6 et E7 du virus du papillome. Les autres méthodes traditionnelles de transfection présentent le désavantage de faire vieillir prématurément les cellules, ce qui est nuisible à ce type d'expérience (Q. Chen, communication personnelle). Les produits des gènes E6 et E7 se fixent respectivement sur les protéines p53 et pRB, inhibant ainsi leur action. Lorsque pRB se lie à la protéine E7, E2F ne peut plus s'y fixer et est donc libre d'activer la transcription de certains gènes (Tommasino, M. et Crawford, L., 1995). L'ARN total de ces populations cellulaires a déjà été extrait en collaboration avec le Prof Q. Chen de l'Université d'Arizona, USA.

Deux types d'expériences sont prévues au laboratoire. Le premier consiste en l'estimation, par RT-PCR, du niveau de transcription des gènes d'intérêt, chez des fibroblastes IMR-90 ayant été stressés à l' H_2O_2 et préalablement transfectés par E6 et E7.

D'autre part, nous avons reçu des fibroblastes WI-38 portant le gène E6, en provenance du laboratoire de J. Campisi à l'Université de Californie à Berkeley, USA. Il est aussi prévu de transfecter des fibroblastes WI-38 avec le gène E7. Ainsi, nous pourrions aussi étudier les niveaux de transcription des gènes d'intérêt lors des stress successifs sous t-BHP lorsque les protéines pRB et p53 sont inactivées. Le laboratoire de Q. Chen, à l'Université d'Arizona, a déjà montré que le gène de la vinculine, une protéine jouant un rôle dans l'ancrage de la matrice extracellulaire au cytosquelette, n'est plus transcrit chez les cellules dont la protéine pRB est inactivée par E7 (communication personnelle) et ce, malgré des stress sublétaux sous H_2O_2 , alors que les cellules dont pRB est active connaissent une élévation du niveau de transcription de cette protéine.

Un deuxième axe de recherche pourrait être de remonter en amont de pRB, de l'augmentation de synthèse de $p21^{waf-1}$ et de l'augmentation d'activité de liaison de p53 à l'ADN.

Le facteur de transcription E2F1, membre de la famille de E2F peut transactiver le gène de $p21^{waf-1}$. Donc, p53, qui déclenche aussi la transcription de $p21^{waf-1}$, et pRB, qui peut fixer E2F1, pourraient aussi intervenir toutes les deux sur la transcription de $p21^{waf-1}$, ce qui peut avoir des effets additifs lorsque pRB est hypophosphorylé, séquestrant ainsi E2F1, et que p53 est active (Hiyama, H. *et al.*, 1998).

Il existe une voie conduisant à la synthèse de $p21^{waf-1}$ qui est indépendante de p53. Cette voie fait au moins intervenir la protéine $p16^{INK-4}$, qui est aussi un inhibiteur de kinases dépendantes de cyclines, tout comme $p21^{waf-1}$. De plus, des relations croisées semblent exister entre la régulation de la phosphorylation de pRb et la synthèse de p16. En effet, l'expression de $p16^{INK-4}$ induit une baisse de transcription du gène de pRB, ainsi que Fang *et al.* l'ont découvert en utilisant des cellules transfectées par $p16^{INK-4}$ ou par un vecteur contrôle (Fang, X. *et al.*, 1998). L'étude de la transcription de $p16^{INK-4}$ pourrait donc être réalisée sur notre système expérimental.

Ensuite, on sait que les stress radicalaires génèrent des cassures simple brin et double brin dans l'ADN. D'une part, les stress radicalaires conduisent à un raccourcissement des télomères (Von Zglinicki, T. *et al.*, 1995). Un mécanisme possible pourrait être un raccourcissement des télomères via la formation de cassures simple brin. Ces cassures pourraient conduire, en cas de non réparation, à la perte de fragments télomériques lors d'une duplication ultérieure de l'ADN. Cette duplication peut, en effet, avoir lieu lorsque les cellules récupèrent un potentiel prolifératif, même amoindri, après les premiers stress successifs t-BHP jusqu'à ce que des stress ultérieurs finissent par stopper définitivement les mitoses.

L'utilisation de bléomycine ou d'actinomycine D cause des dommages doubles brins dans l'ADN et un blocage permanent des mitoses. Dans ce cas, on note une augmentation de la synthèse de $p21^{waf-1}$ et de p53, mais de manière transitoire, $p21^{waf-1}$ étant remplacée par $p16^{INK-4}$, un autre inhibiteur de kinases dépendantes de cyclines (Robles, S.J. and Adami, G.R., 1998). Il serait aussi informatif de savoir si la longueur des télomères se raccourcit dans ces conditions.

D'autre part, les cassures simple brin sont reconnues par p53, notamment via l'activation de la poly(ADP ribose) polymérase (PARP) suite à ces cassures (Varizi, H. *et al.*, 1997). On pourrait donc étudier la formation de cassures simple brin à l'aide d'enzymes de restriction spécifiques des cassures simple brin comme la nucléase S1, de même que l'activation de la PARP et de p53. Ici, il serait très intéressant de comparer les résultats obtenus après un stress unique subléthal sous H_2O_2 , et après des stress successifs sous t-BHP. Cela permettrait peut-être de comprendre pourquoi il suffit d'un seul stress subléthal sous H_2O_2 pour arrêter définitivement la croissance cellulaire, alors que plusieurs stress sublétaux successifs sous t-BHP de même durée sont nécessaires pour obtenir le même effet sur la prolifération cellulaire. Les réactivités relatives de l' H_2O_2 et du t-BHP entre probablement en ligne de compte.

Pourquoi les cellules ayant subi des stress sublétaux et les cellules âgées auraient-elles des changements dans l'expression de certaines protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine et l'ostéonectine?

Ces changements pourraient-ils conduire à une reconnaissance des cellules vieilles *in vivo* et leur subséquente destruction par les cellules du système immunitaire? Cela pourrait-il expliquer que l'on ne détecte qu'un faible pourcentage de fibroblastes présentant une activité β -galactosidase associée à la sénescence dans la peau d'individus âgés? De plus, chez les personnes âgées, on peut facilement faire la différence entre les fibroblastes et kératinocytes issus de fragments de peau exposés ou non au soleil, et donc aux stress sous U.V., ou non: un plus grand nombre de cellules présentant l'activité β -gal associée à la sénescence est observé dans les parties de la peau exposées aux U.V. (Christofalo, Philadelphie, communication personnelle). Les stress pourraient-ils compromettre un éventuel équilibre entre l'apparition des cellules âgées et leur éventuelle destruction par le système immunitaire?

On a observé une augmentation de la quantité de fibronectine lors du vieillissement cellulaire *in vitro* et *in vivo*, dans la peau par exemple (Giacomoni, P.U. et D'Alessio, P., 1996), ce qui correspond bien à nos résultats obtenus à partir des fibroblastes en culture. De plus, on a montré que la fibronectine participe aux changements morphologiques observés lors du vieillissement des cellules. Ceci renforce nos résultats puisqu'on observe une modification importante et similaire de la morphologie cellulaire lors de la sénescence répliquative et lors des effets à long terme des stress oxydatifs sublétaux étudiés dans ce travail. Ces modifications sont attestées par l'évolution des fibroblastes de morphotypes "jeunes" I et II, vers des morphotypes plus tardifs ("âgés") III à VI; Dans ces morphotypes âgés, des "fibres de stress" (stress fibers) sont présentes, ce qui est aussi observé en présence d'un substrat d'attachement cellulaire contenant plus de fibronectine (Wilson, C.S.A. et Schwarzbauer, J.E., 1996).

D'autre part, on peut en effet se poser la question de savoir si la surproduction d'ARNm de fibronectine n'est pas une tentative de la cellule de combler une inactivation, une perte de fonction d'une partie des ARN transcrits ou des protéines synthétisées. Ainsi, lors du vieillissement, l'épissage alternatif de la fibronectine est modifié pouvant produire un plus grand nombre de transcrits de séquences différentes donnant des protéines tronquées (Magnuson, V.L. *et al.*, 1991) incapables d'assurer leur fonction.

On pourrait suivre un raisonnement similaire dans le cas de l'augmentation de la transcription de la sous-unité 4 de la cytochrome C oxydase chez les cellules âgées. Une diminution de son activité a été observée dans des biopsies de muscles squelettiques humains (Lezza, A.M.S. *et al.*, 1994), au cours du vieillissement. La cellule tenterait-elle de compenser cette baisse d'activité par une augmentation de la transcription des gènes correspondant aux différentes sous-unités de l'enzyme? Ce processus pourrait-il être régulé par un manque d'énergie disponible?

L'ostéonectine contribue au remodelage des tissus en induisant l'expression de métalloprotéases (collagénase, gélatinase, stromélysine) dans les fibroblastes humain. Ces métalloprotéases dégradent la matrice extracellulaire et les membranes basales. Or, on observe ces dégradations lors du vieillissement *in vivo* de la peau. Cela a été décrit au cours du vieillissement normal ou provoqué par des expositions aux UV (Giacomoni, P.U. et D'Alessio, P., 1996).

Pichler *et al.* ont montré que l'ostéonectine (ou SPARC) peut inhiber la mitose des cellules endothéliales et des fibroblastes en se fixant à la matrice extracellulaire, ou au PDGF (platelet-derived growth factor) empêchant ainsi la reconnaissance par ce dernier de son récepteur spécifique. La surexpression de l'ostéonectine pourrait alors bloquer la mitose. Peut-être s'agit-il d'un mécanisme visant à stopper les mitoses de cellules endommagées par les stress oxydatifs et présentant de ce fait des risques de transformation cellulaire?

L'ostéonectine est liée au vieillissement d'une autre manière. Elle interviendrait aussi dans l'ostéoporose en diminuant la fixation du calcium conduisant à une fragilisation des os.

Dans l'optique de ce travail, les stress oxydatifs sublétaux pourraient précipiter l'augmentation de la synthèse de ces protéines et donc l'apparition de ces pathologies.

L'apolipoprotéine J, quant à elle, se lierait au peptide β -amyloïde, pouvant ainsi favoriser la formation des plaques séniles des personnes atteintes par la maladie d'Alzheimer (Stone, D.J. *et al.*, 1998).

L'apolipoprotéine J est surexprimée dans des maladies dégénératives comme la maladie d'Alzheimer ou la maladie de la vache folle. Michel *et al.* montrent que les 14 paires de bases conservées dans le promoteur de ce gène chez tous les vertébrés sont spécifiquement reconnues par le facteur de transcription HSF1 (heat shock factor 1) qui est responsable de la transcription du gène de l'apolipoprotéine J par exemple lors de stress thermique. Cette protéine pourrait, tout comme de nombreuses "heat shock" protein (HSP), protéger en partie les cellules lors de certains stress oxydatifs où les

HSP agissent en tant que chaperones empêchant l'altération radicalaire de protéines (Michel, D. *et al.*, 1997).

Si cela était le cas, cela expliquerait facilement pourquoi, d'une part, l'apolipoprotéine J est retrouvée dans la maladie d'Alzheimer, en présence du peptide β -amyloïde et pourquoi, d'autre part, l'apolipoprotéine bloque l'aggrégation du peptide β -amyloïde.

Le groupe de Gonos à Athènes vient de montrer que la transfection du gène de l'apolipoprotéine J, dans des fibroblastes immortalisés murins et humains permet une meilleure survie cellulaire lors de stress sous éthanol et sous t-BHP (informations communiquées par le Pr. Gonos, réunion du projet européen Biomed "Genage"). Cette protéine pourrait donc aussi avoir une fonction de protection cellulaire lors des stress oxydatifs, ce qui expliquerait peut-être sa présence au niveau des plaques séniles. On sait en effet que la présence de protéine β -amyloïde peut provoquer des stress radicalaires dans les cellules nerveuses. Dans les fibroblastes, la présence de l'apolipoprotéine J lors du vieillissement normal ou accéléré par des stress pourrait être la conséquence d'une augmentation de la production de radicaux libres par ces cellules devenues âgées. On sait très bien que, dans de multiples types cellulaires de mammifères ou d'insectes comme les drosophiles, il y a une augmentation de la production radicalaire lors du vieillissement cellulaire.

D'autre part, on peut se demander si la surexpression ou la sous-expression de certaines sous-unités de complexes protéiques participant au transport des électrons dans la chaîne mitochondriale respiratoire, pourrait jouer un rôle dans l'augmentation de cette production radicalaire. L'augmentation de la transcription de la sous-unité 4 de la cytochrome c oxydase pourrait-elle éventuellement être responsable en partie de cette augmentation de production radicalaire en modifiant la stoechiométrie des sous-unités de certains complexes protéiques qui permettrait une fuite des électrons dans la chaîne respiratoire.

L'augmentation de la transcription de l' $\alpha 1(I)$ -procollagène pourrait-elle conduire à une augmentation de la synthèse du collagène de type I, modifiant ainsi les proportions des différents types de collagènes présents dans les espaces intercellulaires, rendant possible des modifications de structure tissulaire par exemple via une sensibilité accrue ou décrue à certaines collagénases.

Concernant les gènes de la sous-unité α des GTP binding proteins, SM 22 et SS 9, trop peu de fonctions des protéines pour lesquelles ils

codent sont connues pour nous permettre de faire des hypothèses quant aux effets de l'augmentation de la quantité d'ARNm codant pour ces gènes lors du vieillissement normal ou accéléré par des stress oxydatifs. Des études de transfection pourraient permettre de tester si ces gènes ont un rôle à jouer, par exemple dans la résistance au stress, si ces gènes sont surtranscrits à la suite d'accumulation de dommages, ou s'il jouent un rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire.

D'autres études peuvent aussi être réalisées sur l'expression sous forme de protéine des gènes étudiés dans ce travail, pour savoir s'il existe, ou non des parallélismes entre les augmentations de quantité d'ARN observées et l'expression protéique.

Quoi qu'il en soit, nos travaux et ceux de Gonos montrent que les mêmes gènes connaissent une augmentation de la quantité de leurs transcrits (ARNm) dans différentes conditions:

- Premièrement, chez les fibroblastes embryonnaire de rat immortalisés (lignée tsa) ayant subi un arrêt irréversible de leur croissance suite à l'inactivation thermique de l'antigène T.
- Deuxièmement, lors de la sénescence répliquative *in vitro* des fibroblastes humains WI-38 et IMR-90 et des ostéoblastes humains (Gonos, E.S. *et al.*, 1998).
- Troisièmement, lors du traitement des fibroblastes humains IMR-90 par des doses sublétales d'H₂O₂. Les travaux en cours sur les fibroblastes humains WI-38 traités au moyen de t-BHP vont aussi dans ce sens.

Qu'est-ce qui pourrait être commun à ces trois situations différentes, mis à part l'arrêt forcé de la division cellulaire ou l'enclenchement d'un processus de différenciation?

ANNEXES

Tableau récapitulatif des différentes amorces utilisées.

<i>Nom de l'amorce</i>	<i>Séquence</i>	<i>POSITION</i>
H2	5'-GGGGAAGCGAGGTTGACCTG-3'	13650-13631
L2	5'-CCGGGGGTATACTACGGTCA-3'	8150-8166
H1	5'-GGGAGGAGTAATCAGAGGTG-3'	3817-3836
L1	5'-AACATACCCATGGCCAACCT-3'	3304-3323
H3	5'-GATGAGAGTAATAGATAGG-3'	13582-13560
L3	5'-CAGTTTCATGCCCATCGTC-3'	8193-8212
C1	5'-GGGAAGCTTGAGGGAGGTAGGTAGTA-3'	8458-8476
C2	5'-GGGAAGCTTGGCAGCCTAGCATTAGCA-3'	13480-13460
A2	5'-GGGGAAGCTTGGTCGGGGCGGTGATG-3'	3538-3520
B2	5'-GGGGAAGCTTCTCACCATCGCTCTTCTACTATG-3'	3542-3565

Reported mtDNA Deletions

Deletion Function (nt:nt)	Deletion Size(bp)	Genes Deleted	Flanking Repeats	Repeat Location (nt)	N	References
05:112	-6	D loop-	NR		23	[Santos, 1994 #452; Santos, 1994 #460;
70:5152	-4681	MTTFH-MTND2	D, 12/13	471-483/5152-5163	1	[Johns, 1991 #228]
02:5443	-4939	MTTFH-MTND2	D, 8/9	504-512/5443-5451	1	[Hamman, 1992 #149]
47:4443	-3895	MTTM-	D, 13/13	536-548/4430-4442	2	[Moraes, 1991 #322; Moraes, 1992 #335;
36:5447	-3610	MTNRN2-MTND2	D, 4/4	1837-1840/5447-5451	8	[Katayama, 1991 #253]
73:14161	-10987	MTNRN2-MTND5	D, 8/8	3166-3173/14154-14161	3	[Miyabayashi, 1991 #312]
23:3588	-264	MTND1-MTND1	D, 5/5	3330-3334/3597-3601	1	[Horpon, 1996 #1199]
98:14822	-10422	MTTC-MTCYB	D, 10/10	4389-4398/14812-12821	1	[Ballinger, 1994 #12; Ballinger, 1992
86:13923	-8136	MTTC-MTND5	NR		1	[Degoul, 1991 #104]
93:12767	-6973	MTTC-MTND5	D, 6/7	5786-5792/12757-12763	1	[Rotig, 1995 #295]
35:12661	-6825	MTND5-MTTY	D, 6/8	5836-5843/12666-12673	1	[Mita, 1990 #317]
23:14424	-8400	MTTC1-MTND6	D, 1/1	6023/14423	1	[Ota, 1991 #382]
74:9179	-3104	MTTC1-MTATP6	D, 4/4	6080-6083/9181-9184	1	[Rotig, 1995 #295]
75:13799	-7723	MTTC1-MTND5	D, 9/9	6076-6084/13799-13807	1	[Mita, 1990 #317]
26:13456	-7279	MTTC1-MTND5	D, 9/9	6218-6226/13447-13455	1	[Ota, 1991 #382]
38:14103	-7864	MTTC1-MTND5	D, 4/4	6235-6238/14099-14102	1	[Blok, 1995 #884]
			D, 9/9	6230-6238		
25:13989	-7663	MTTC1-MTND5	D, 16/17	6326-6341/13889-14004	1	[Larsson, 1992 #271; Larsson, 1990 #27
29:13994	-7664	MTTC1-MTND5	D, 17/18	6325-6340/13989-14005	1	[Johns, 1989 #232]
30:13994	-7663	MTTC1-MTND5	D, 11/11	6331-6341/13994-14004	1	[Mita, 1990 #317]
80:14096	-7715	MTTC1-MTND5	D, 6/6	6369-6374/14099-14104	1	[Mita, 1990 #317]
65:14135	-7669	MTTC1-MTND5	D, 11/11	6466-6476/14135-14145	1	[Rotig, 1993 #446]
93:14596	-7402	MTTC1-MTND6	I, 5/5	7169-7173/14609-14613	1	[Fischel-Ghodsian, 1992 #120]
			I, 5/6	7176-7182		
			I, 4/5	7160-7164		
38:13476	-6037	MTTC1-MTND5	D, 1/1	7439/13476	1	[Hamman, 1992 #142]
49:15926	-8476	MTTS1-MTTT	NR		1	[Degoul, 1991 #101]
91:11004	-3512	MTTS1-MTND4	D, 8/8	7484-7491/10996-11003	1	[Degoul, 1991 #101; Degoul, 1991 #104]
93:12762	-5268	MTTS1-MTND5	D, 3/3	7491-7493/12759-12761	1	[Ota, 1994 #284]
60:14428	-6926	MTND6-MTTS1	D, 5/5	7502-7506/14428-14432	1	[Mita, 1990 #317]
35:15440	-7804	MTTC2-MTCYB	D, 4/4	7627-7630/15432-15435	1	[Moraes, 1991 #332]
69:15437	-7767	MTTC2-MTCYB	D, 8/8	7662-7669/15429-15436	1	[Degoul, 1991 #101; Nelson, 1992 #356]
697:12364	-4666	MTTC2-MTCYB	NR		1	[Larsson, 1992 #270; Oldfors, 1992 #37
777:13794	-6016	MTTC2-MTND5	D, 4/4	7780-7783/13796-13799	1	[de Vries, 1992 #295]
			D, 4/4	7789-7792		
808:14799	-6990	MTTC2-MTCYB	D, 6/6	7809-7814/14799-14804	1	[Nakai, 1994 #350]
815:15381	-7565	MTTC2-MTCYB	D, 8/8	7816-7823/15381-15388	1	[Mita, 1990 #317]
829:14135	-6305	MTTC2-MTND5	D, 6/6	7824-7829/14129-14134	1	[Bet, 1994 #882]
841:13905	-6063	MTTC2-MTND5	D, 6/8	7842-7849/13905-13912	108	[Hsieh, 1994 #205; Wei, 1992 #601; Yen
841:13905	-6063	MTTC2-MTND5	D, 6/8	7842-7849/13905-13912	28	[Wei, 1992 #601; Yen, 1992 #602]
845:9748	-1902	MTTC2-MTCO3	D, 3/3	7838-7840/9747-9749	1	[Mita, 1990 #317]
			I, 4/4	7850-7853		
			D, 4/4	7845-7848		
974:15496	-7521	MTTC2-MTCYB	D, 8/8	7975-7982/15496-15503	2	[Mita, 1990 #317; Nakase, 1990 #353; Z
032:16075	-8042	MTTC2-MTATT	D, 5/5	8030-8034/16071-16075	1	[Linnane, 1992 #285]
210:15339	-7128	MTTC2-MTCYB	NR		1	[Moraes, 1992 #335; Moraes, 1995 #265]
213:13991	-5777	MTTC2-MTND5	D, 7/7	8214-8220/13991-13997	1	[Hinokio, 1995 #221]
271:8281	-9	Intergenic-region	NR		>700	[Ballinger, 1992 #11; Barrientos, 1995
278:13770	-5491	MTTK-MTND5	D, 6/6	8272-8277/13763-13768	1	[Norby, 1994 #368]
			D, 9/9	8281-8289		
304:15055	-6750	MTTK-MTCYB	D, 6/8	8305-8312/15049-15056	1	[Rotig, 1995 #295]
426:12894	-4467	MTND5-MTATP8	D, 5/5	8416-8420/12890-12894	1	[Mita, 1990 #317]
			D, 5/5	8427-8431		
			I, 3/3	8423-8425		
468:13446	-4977	MTND5-MTATP8	D, 13/13	8470-8482/13447-13459	2	[Degoul, 1991 #101; Shoffner, 1989 #42
469:13447	-4977	MTND5-MTATP8	D, 13/13	8470-8482/13447-13459	>200	[Anan, 1995 #873; Barrell, 1979 #14; B
517:15421	-6903	MTATP8-MTCYB	D, 5/5	8512-8517/15408-15412	1	[Mita, 1990 #317; Zupanc, 1991 #627]
			D, 6/7	8520-8526		
563:13758	-5196	MTATP8-MTND5	NR		1	[Hayashi, 1991 #165; Hayashi, 1994 #16
563:14596	-6032	MTATP8-MTND6	D, 6/6	8558-8563/14588-14593	1	[Degoul, 1991 #101]
570:13236	-4665	MTATP8-MTCYB	I, 5/6	8566-8571/13237-13242	1	[Lestienne, 1989 #231; Nelson, 1989 #3
573:15727	-7153	MTATP8-MTCYB	D, 11/14	8574-8587/15727-15737	1	[Larsson, 1992 #271]
			D, 8/8	8594-8601		
580:15731	-7150	MTATP8-MTCYB	D, 7/7	8581-8587/15731-15737	1	[Pang, 1994 #401]
582:15957	-7374	MTATP8-MTTP	NR		1	[Morikawa, 1993 #332]
623:15662	-7038	MTATP8-MTCYB	D, 7/7	8617-8623/15656-15662	1	[Tanaka, 1989 #542]
624:13886	-5261	MTATP8-MTND5	D, 8/8	8617-8624/13877-13885	1	[Degoul, 1991 #101]
631:13513	-4881	MTATP8-MTND5	D, 7/7	8625-8631/13506-13512	1	[Zhang, 1995 #1038]
637:16084	-7446	MTATP8-MTTP	NR		1	[Remes, 1994 #437]
648:16085	-7436	MTATP8-MTTP	D, 12/12	8637-8648/16073-16084	>70	[Hattori, 1991 #158; Hattori, 1991 #15
707:13723	-5015	MTATP8-MTND5	NR		1	[Johns, 1989 #232]
823:15855	-7031	MTATP8-MTCYB	D, 10/10	8814-8823/15845-15854	1	[Degoul, 1991 #101]
828:14896	-6067	MTATP8-MTCYB	D, 10/10	8829-8838/14896-14095	1	[Larsson, 1992 #271; Larsson, 1990 #27
892:16072	-7079	MTATP8-MTTP	NR		1	[Hattori, 1991 #158; Ito, 1992 #212; Y
9144:13816	-4671	MTATP8-MTND5	D, 8/8	9137-9144/13808-13815	1	[Ota, 1991 #382]

4:16076	-8041	D, 5/5	8030-8034/16071-16075	Proband	[Zhang, 1992 #623]
3:16070	-7856	D, 6/6	8207-8212/16071-16076	Proband	[Zhang, 1992 #623]
2:15730	-7737	D, 7/7	7986-7992/15723-15729	Proband	[Zhang, 1992 #623]
9:16075	-7635	D, 7/7	8433-8439/16068-16074	Proband	[Zhang, 1992 #623]
8:16085	-7436	D, 12/12	8637-8648/16073-16084	Proband	[Zhang, 1992 #623]
76:14812	-6335	D, 7/7	8470-8476/14805-14811	Proband	[Zhang, 1992 #623]
59:13787	-5827	D, 6/6	7954-7959/13781-13786	Proband	[Zhang, 1992 #623]
75:13532	-5756	D, 7/7	7769-7775/13525-13531	Proband	[Zhang, 1992 #623]
82:13460	-4977	D, 13/13	8470-8482/13447-13459	Proband	[Zhang, 1992 #623]

Reported Multiple mtDNA Deletions Within dividuals

Deletion Location (nt:nt)	Deletion Size(bp)	Repeat Type	Repeat Location (nt)	Patient ID	References
16:15802	-7485	NR		Proband	[Pang, 1994 #401]
44:15633	-7288	NR		Proband	[Pang, 1994 #401]
80:15731	-7150	D, 7/7	8581-8587/15731-15737	Proband	[Pang, 1994 #401]
53:15585	-7031	NR		Proband	[Pang, 1994 #401]
67:11312	-3344	D, 5/5	7968-7972/11312-11316	Sibl, Sib2	[Casademont, 1994 #58]
31:13766	-4834	D, 6/6	8931-8936/13768-13773	Sibl, Sib2, Mother	[Casademont, 1994 #58]
74:13990	-5215	D, 6/6	8772-8777/14001-14006	Sibl, Sib2, Mother	[Casademont, 1994 #58]
		D, 5/5	8775-8779/13990-13994		
27:13698	-4970	D, 6/6	8712-8717/13688-13693	Sibl, Sib2, Mother	[Casademont, 1994 #58]
		D, 5/5	8714-8719/13698-13703		
45:15761	-7915	D, 4/4	7841-7845/15751-15753	III-1	[Cormier, 1991 #85]
		D, 7/8	7850-7857/15762-15769		
31:15761	-7829	D, 7/8	7924-7931/15760-15767	III-1	[Cormier, 1991 #85]
		D, 4/4	7939-7942/15767-15770		
		I, 4/4	7917-7920/15760-15763		
19:15032	-7412	D, 4, 4	7620-7623/15032-15035	III-1	[Cormier, 1991 #85]
		D, 4/5	7609-7613/15027-15031		
		I, 4/4	7614-7617/15027-15030		
44:16064	-6219	D, 9/10	9833-9844/16061-16070	II-5	[Cormier, 1991 #85]
		D, 4/5	9848-9852/16073-16077		
		I, 4/4	9835-9838/16056-16059		
66:15801	-5834	D, 4/5	9952-9956/15798-15802	II-5	[Cormier, 1991 #85]
		D, 4/5	9969-9973/15809-15813		
		D, 4/4	9971-9974/15807-15810		
		I, 4/4	9969-9972/15796-15799		
86:13923	-8136	D, 4/4	5785-5788/13918-13921	22	[Cormier, 1991 #85]
87:13920	-8132	D, 4/4	5785-5788/13918-13921	22	[Cormier, 1991 #85]
31:13513	-4881	D, 7/7	8625-8631/13506-13512	Proband	[Zhang, 1995 #1038]
87:16071	-7683	NR		Proband	[Zhang, 1995 #1038]
12:16072	-7459	NR		Proband	[Zhang, 1995 #1038]
41:14005	-7663	D, 11/11	NR	Proband	[Johns, 1992 #244]
80:16071	-4591	D, 3/4	NR	Proband	[Johns, 1992 #244]
591:13052	-3460	D, 6/6	9546-9591/13046-13051	Proband	[Sahashi, 1992 #450]
794:16072	-8277	D, 6/6	7794-7799/16072-16077	3-II-5	[Yuzaki, 1989 #616]
920:16071	-8150	D, 4/4	7919-7922/16065-16068	2-III-3	[Yuzaki, 1989 #616]
		D, 4/4	7915-7918/16069-16072		
899:15642	-7742	D, 4/4	7905-7908/15646-15649	1-III-8	[Yuzaki, 1989 #616]
079:15312	-6232	D, 5/5	9075-9079/15307-15311	2-IV-5	[Yuzaki, 1989 #616]
193:15322	-6128	D, 6/7	9189-9194/15319-15325	3-III-9	[Yuzaki, 1989 #616]
		D, 4/4	9191-9193/15313-15316		
440:14083	-4642	D, 10/10	9431-9440/14072-14081	1, 2	[Yuzaki, 1989 #616]
532:14135	-4602	D, 7/7	9526-9532/14127-14133	1, 2	[Yuzaki, 1989 #616]
509:14147	-4537	D, 5/5	9606-9610/14141-14145	1, 2	[Yuzaki, 1989 #616]
281:13810	-4528	D, 8/8	9274-9281/13801-13808	1, 2	[Yuzaki, 1989 #616]
444:13964	-4519	D, 8/8	9437-9444/13955-13962	1, 2	[Yuzaki, 1989 #616]
574:1395	-4376	D, 4/4	9571-9574/13946-13949	1, 2	[Yuzaki, 1989 #616]
587:13953	-4366	D, 9/9	9579-9587/13943-13951	1, 2	[Yuzaki, 1989 #616]
497:13735	-4237	D, 12/12	9486-9497/13722-13733	1, 2	[Yuzaki, 1989 #616]
758:14138	-3379	D, 8/8	10151-10758/14128-14136	1, 2	[Yuzaki, 1989 #616]
925:14152	-3226	D, 5/5	10921-10925/14146-14150	1, 2	[Yuzaki, 1989 #616]
761:14252	-490	D, 8/8	13754-13761/14243-14250	1, 2	[Yuzaki, 1989 #616]
600:14138	-453	D, 5/5	9596-9600/14132-14136	1, 2	[Yuzaki, 1989 #616]
469:16071	-8601	D, 4/4	7469-7472/16071-16074	26	[Zeviani, 1989 #622]
817:16071	-8253	D, 6/6	7819-7824/16071-16076	27	[Zeviani, 1989 #622]
818:16071	-8252	D, 6/6	7819-7824/16071-16076	26	[Zeviani, 1989 #622]
819:16071	-8251	D, 6/6	7820-7825/16071-16076	27	[Zeviani, 1989 #622]
819:16070	-8250	D, 6/6	7819-7824/16071-16076	26	[Zeviani, 1989 #622]
869:16075	-8205	D, 7/7	7872-7878/16072-16078	26	[Zeviani, 1989 #622]
920:16078	-8157	D, 4/4	7915-7918/16068-16071	26	[Zeviani, 1989 #622]
		D, 4/4	7916-1919/16081-16084		
914:16070	-8155	D, 4/4	7915-7918/16069-16072	53	[Zeviani, 1989 #622]
922:16074	-8151	D, 4/4	7919-7922/16065-16068	26	[Zeviani, 1989 #622]
		D, 4/4	7915-7918/16065-16068		
919:16070	-8150	D, 4/4	7915-7918/16069-16072	27	[Zeviani, 1989 #622]
		D, 4/4	7919-7922/16065-16068		
989:16071	-8081	D, 5/5	7986-7990/16065-16069	26	[Zeviani, 1989 #622]
989:16071	-8081	D, 5/5	7986-8990/16065-16069	27	[Zeviani, 1989 #622]
991:16070	-8078	D, 5/5	7986-7990/16065-16069	26	[Zeviani, 1989 #622]
990:16068	-8077	D, 5/5	7986-7990/16065-16069	27	[Zeviani, 1989 #622]
029:16071	-8041	D, 6/7	8030-8036/16071-16076	27	[Zeviani, 1989 #622]
030:16071	-8040	D, 6/7	8030-8036/16071-16076	27	[Zeviani, 1989 #622]
030:16070	-8039	D, 6/7	8030-8036/16071-16076	52	[Zeviani, 1989 #622]
254:16070	-7815	D, 3/3	8252-8254/16071-16073	53	[Zeviani, 1989 #622]
636:16073	-7436	D, 12/12	8637-8648/16073-16084	52	[Zeviani, 1989 #622]
030:16075	-8044	D, 5/5	8030-8034/16071-16075	Proband	[Zhang, 1992 #621]

80:14281	-5100	MTATP6-MTND6	D, 4/4	9172-9175/14289-14292	1 [Degoul, 1991 #101]
91:12909	-3717	MTATP6-MTND5	D, 3/3	9189-9191/12906-12908	1 [Tanaka, 1989 #542]
38:15576	-6377	MTCOL-MTCYB	D, 5/5	9226-9230/15568-15572	1 [Superti-Furga, 1993 #531]
57:13865	-4507	MTCOL-MTND5	D, 16/18	9345-9361/13851-13868	1 [Johns, 1989 #232]
15:13055	-3539	MTCOL-MTND5	D, 7/9	9517-9525/13055-13063	1 [Reynier, 1994 #440]
74:12972	-3397	MTCOL-MTND5	D, 7/7	9568-9574/12965-12971	15 [Torii, 1992 #553]
95:15897	-5901	MTTG-MTTT	D, 9/9	9998-10006/15895-15903	1 [Rotig, 1991 #447; Rotig, 1995 #995]
50:15076	-5025	MTTG-MTCYB	M, 5/5	10051-10055/15076-15080	1 [Vazquez-Acevedo, 1995 #1027]
58:14593	-4534	MTND6-MTND3	D, 5/5	10059-10063/14593-14597	1 [Mita, 1990 #317; Moraes, 1992 #335]
54:15945	-5790	MTND3-MTTT	D, 5/7	10138-10144/15944-15950	1 [Mita, 1990 #317; Moraes, 1995 #265]
			I, 6/6	10152-101	
			D, 5/5	10152-101	
69:14435	-4265	MTND3-MTND6	D, 5/5	10161-10165/14424-14428	1 [Degoul, 1991 #103]
90:13753	-3562	MTND3-MTND5	D, 8/8	10191-10198/13753-13760	1 [Rotig, 1991 #447; Rotig, 1995 #995]
67:12829	-2461	MTND3-MTND5	D, 3/3	10365-10367/12826-12828	1 [Kapsa, 1994 #233]
70:15570	-5199	MTND3-MTCYB	D, 5/5	10366-10370/15568-15572	1 [Mita, 1990 #317]
			D, 7/8	10377-103	
87:15913	-5325	MTND4L-MTTT	D, 6/6	10576-10581/15905-15910	1 [Mita, 1990 #317]
98:13206	-2607	MTND4L-MTND5	D, 6/6	10587-10592/13192-13197	1 [Rotig, 1995 #997]
65:14856	-4190	MTND4L-MTCYB	D, 10/11	10666-10676/14856-14866	1 [Cormier-Daire, 1994 #894; Rotig, 1991]
76:14868	-4191	MTND4L-MTCYB	D, 11/11	10666-10676/14856-14866	1 [Rotig, 1990 #445]
44:14124	-3379	MTND4L-MTND5	D, 9/10	10745-10754/14124-14133	1 [Cormier-Daire, 1994 #894]
41:15362	-4420	MTND4-MTCYB	D, 10/10	10942-10951/15362-15371	1 [Mita, 1990 #317]
52:15837	-4884	MTND4-MTCYB	D, 9/9	10953-10961/15837-15845	1 [Larsson, 1992 #271; Larsson, 1990 #27]
			D, 5/5	10942-109	
			D, 5/5	10963-109	
61:15846	-4884	MTND4-MTCYB	NR		1 [Oldfors, 1992 #379]
32:13980	-2747	MTND4-MTND5	D, 9/9	11234-11242/13981-13989	1 [Cormier, 1990 #84; Rotig, 1990 #445;
68:15786	-4417	MTND4-MTCYB	D, 5/5	11364-11368/15783-15787	1 [Degoul, 1991 #103]
02:14412	-2309	MTND4-MTND6	D, 10/10	12103-12112/14412-14421	5 [Hamman, 1992 #148; Hamman, 1992 #14
03:14414	-2310	MTND4-MTND6	D, 10/10	12103-12112/14412-14421	1 [Degoul, 1991 #103]
13:14422	-2308	MTND4-MTND6	D, 10/10	12103-12112/14412-14421	1 [Rotig, 1995 #995]
03:15355	-3151	MTTH-MTCYB	NR		1 [Sano, 1993 #454]

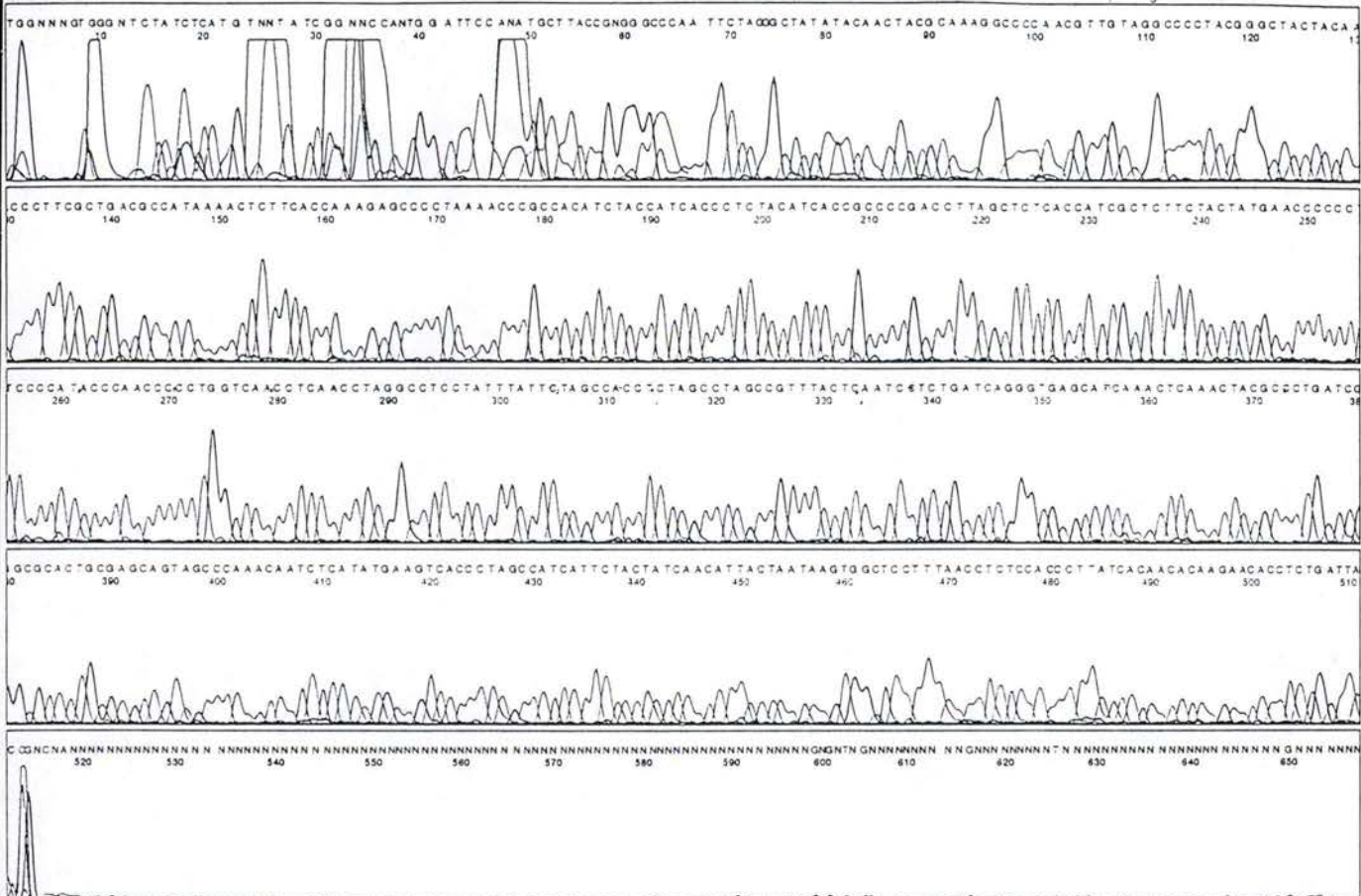
identité: 97,7%

ABI PRISM

1 1

Signal G:75 A:210 C: T:171
DT (dR Set Any-Primer)
dRhod
Points 839 to 8268 Base 1: 839

Spacing: 8.39 ABI100



Spectre de séquençage du fragment sauvage H2

identité: 94,4%

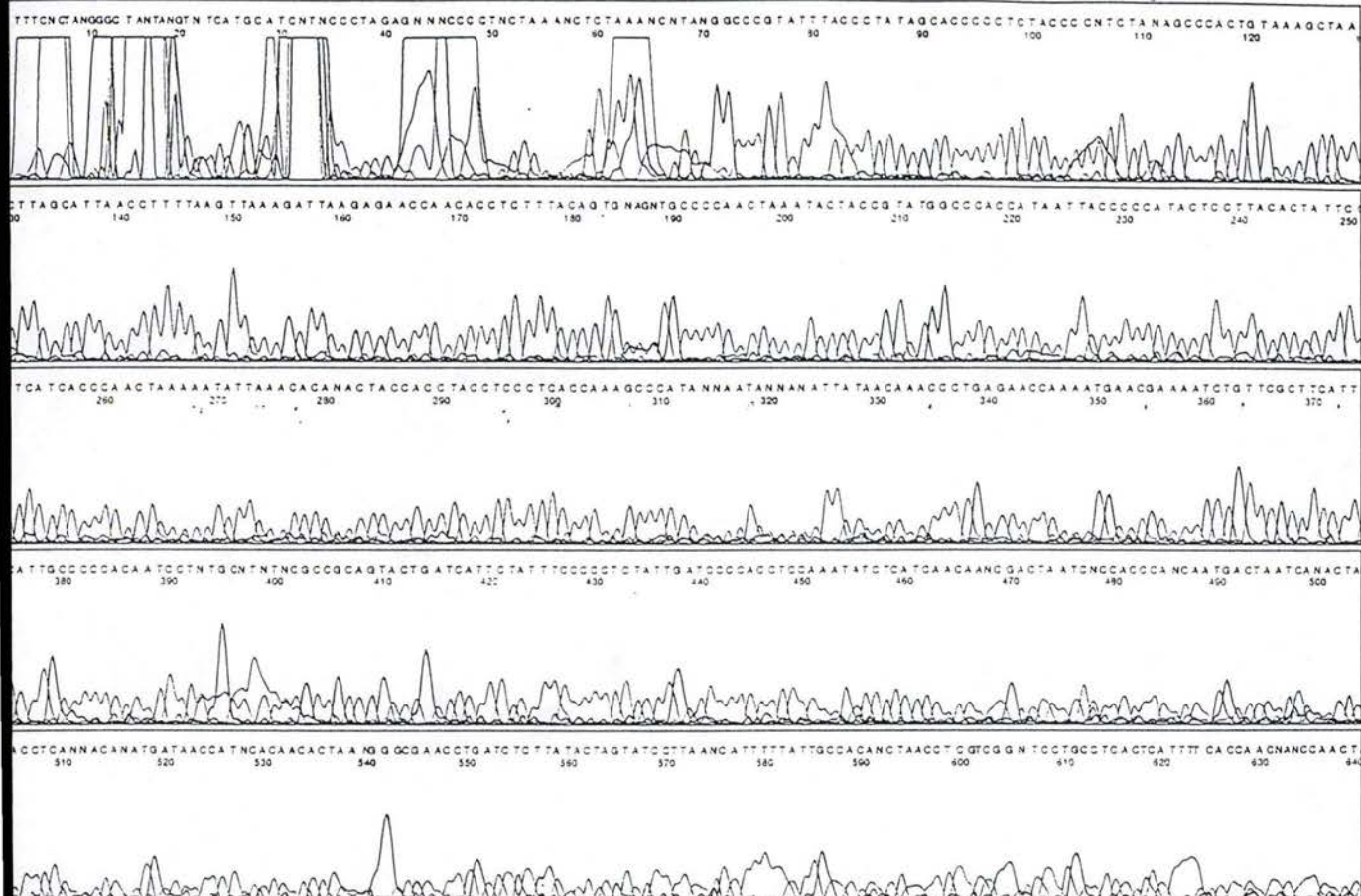


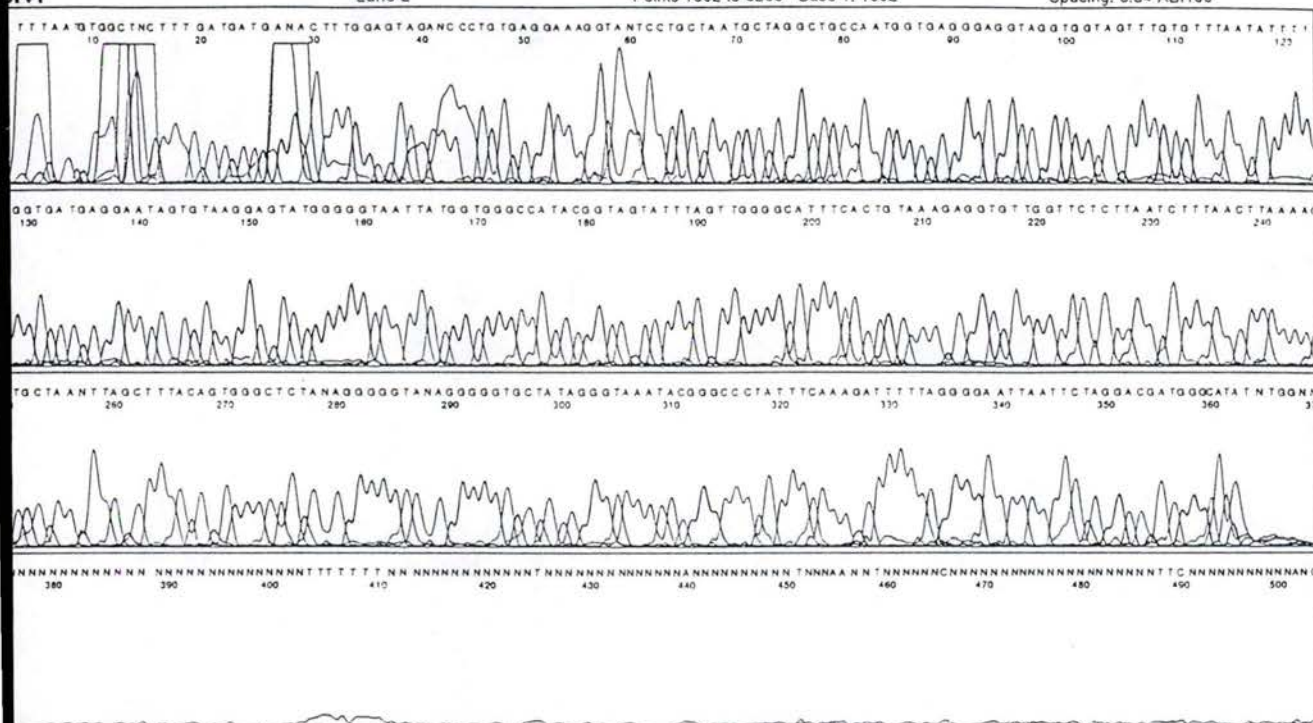
Model 377
Version 2.1.1

L1 christophe
Lane 16

Signal G:147 A:249 4 T:152
DT (dR Set Any-Prim.
dRhod
Points 1023 to 8268 Base 1: 1023

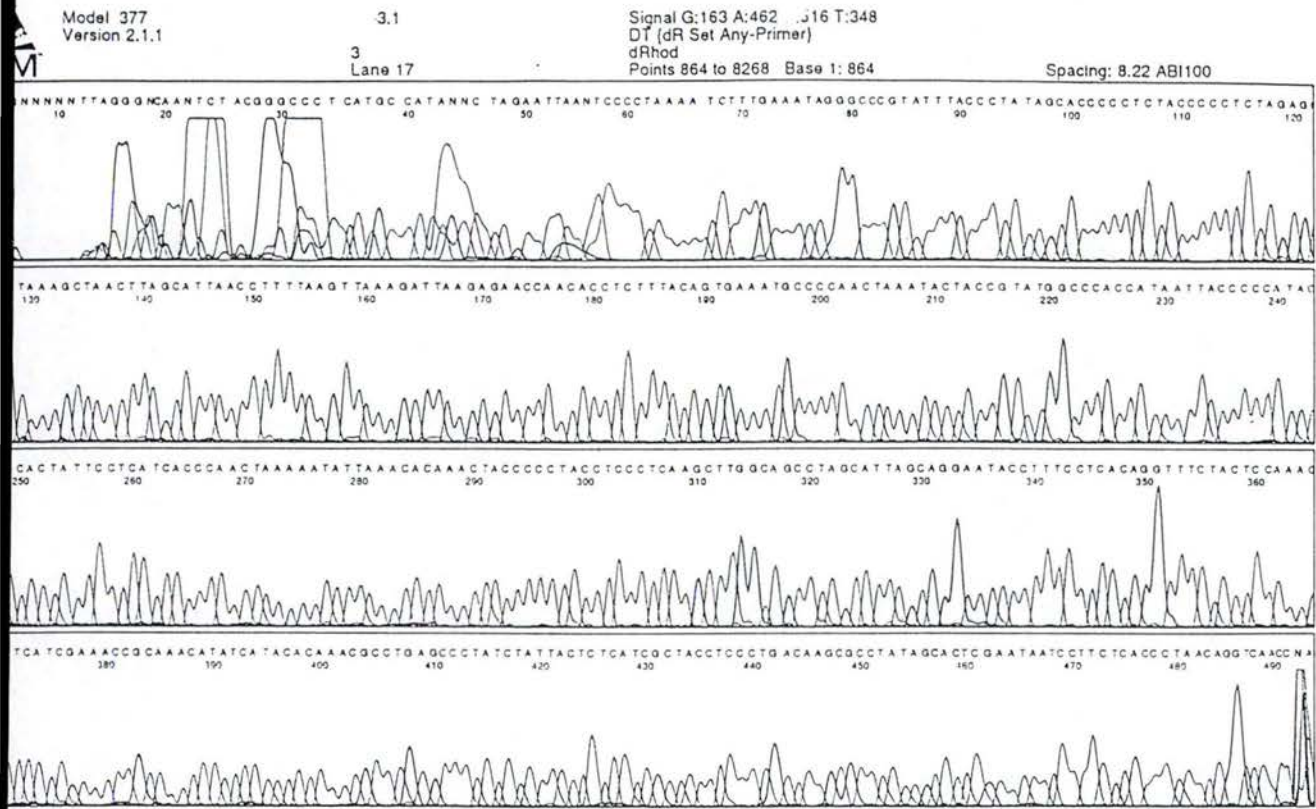
Soacing: 8.55 ABI100





Spectre de séquençage du standard de H2

identité: 96,7%



Spectre de séquençage du standard de H1

identité: 96,0%

Model 377
Version 2.1.1

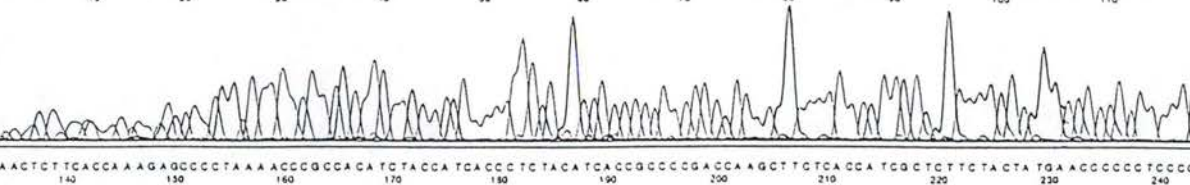
03-L1 2.1

L1 2
Lane 3

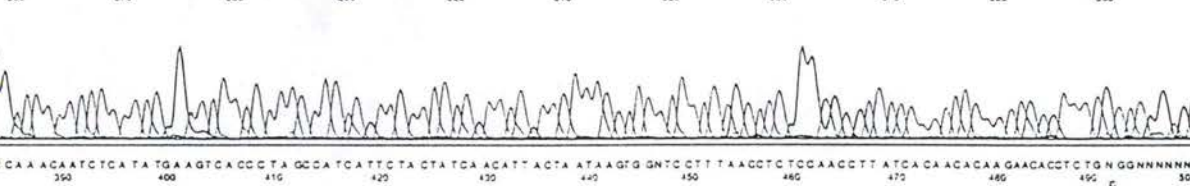
Signal G:244 A:786 C:622 T:422
DT (dR Set Any-Primer)
dRhod
Points 879 to 8264 Base 1: 879

spacing: 8.51 AB1100

ANTG TTTC TTTTC TAA TCGCAATG GCATTTCCTA A TGCTTACCGAAACGA AAAAT TCTAGGCTA TATACA ACTACGCA AAG G CCGCA ACG T TG TAG G CCGCTA G G GCTACTACA ACCCT



ACCCCTGCTCAACCTCAACCTAGGCTCTCTA TTTATTTCTA GCCACCTCTA GCCTA GCCCTTTACTCAATCTCTCTGATCAAGGCTGAAGCA TCAAACTCAAACTACGCTCTATCGGCGC



BIBLIOGRAPHIE

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. et Struhl, K. *Current Protocols in Molecular Biology* Janssen, K. Ed. New-York, Wiley & Sons, 1995

Baumer, A., Zhang, C., Linnane, A.W. et Nagley, P. Age-Related Human mtDNA Deletions: A Heterogenous Set of Deletions Arising at a Single Pair of Directly Repeat Sequences. *Am. J. Hum. Genet.* **54**, 618-630, 1994

Bayreuther, K., Rodemann, H.P., Francz, P.I. et Maier, K. Differentiation of Fibroblast Stem Cells. *J. Cell. Sci. Suppl.* **10**, 115-130, 1988a

Bayreuther, K., Rodemann, H.P., Hommel, R., Dittmann, K., Albiez, M. et Francz, P.I. Human Skin Fibroblasts *in vitro* Differentiate Along a Terminal Cell Lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5112-5116, 1988b

Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.-P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S. et Wright, W.E. Extension of Life-Span by Introduction of Telomerase into Normal Human Cells. *Science* **279**, 349-352, 1998

Campisi, J., Dimri, G.P. et Hara, E. Control of Replicative Senescence. In : *Handbook of the Biology of Ageing* Vol. 4 Holbrook, J.N. Ed. 121-149, San Diego, 1996

Corral-Debrinski, M., Horton, T., Lott, M.T., Shoffner, J.M., Beal, M.F. et Wallace, D.C. Mitochondrial DNA Deletions in Human Brain: Regional Variability and Increase with Advanced Age. *Nat. Genet.* **2**, 324-329, 1992

Parker, D.W. et Davis, R.E. L'hypothèse des Mitochondries. *La Recherche* **303**, 74-75, 1997

Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medranos, E. E., Linskens, M., Rubeli, I., Pereira-Smith, O., Peacocke, M. et Campisi, J. A Biomarker That Identifies Senescent Human Cells in Culture and in Aging Skin *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 9363-9367, 1995

Dimri, G.P., Nakanushi, M., Desprez, P.Y., Smith, J.R. et Campisi, J. Inhibitory of E2F Activity by the Cyclin Dependent Kinases Inhibitor p21 in Cells Expressing or Lacking a Functional Retinoblastoma Protein. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 2987-2997, 1996

Fahn, H.J., Wang, L.S., Hriek, R.H., Chang, S.C., Kao, S.H., Huang, M.H. et Wei, Y.H. Age-Related 4,977 bp Deletion in Human Lung Mitochondrial DNA. *Am. J. respir. Crit. Care Med.* **154**, 1141-1145, 1996

Fang, X., Jin, X., Xu, H.-J., Liu, L., Peng, H.-Q., Hogg, D., Roth, J.A., Yu, Y., Bast, R.C. et Mills, G.B. Expression of p16 Induces Transcriptional Downregulation of the RB Gene. *Oncogene* **16**, 1-8, 1998

Filser, N., Margue, C. et Richter, C. Quantification of Wild-Type Mitochondrial DNA et Its 4,8 kb Deletion in Rat Organs. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **233**, 102-107, 1997

Giacomoni, P.U. et D'Alessio, P. Skin Ageing: The Relevance of Antioxidants In : *Molecular Gerontology* Rattan, S.I.S. & Toussaint, O. Eds. 177-191, New York, Plenum Press, 1996

Gilchrest, B.A. and Bohr, V.A. Aging Processes, DNA Damage and Repair. *FASEB J.* **11**, 322-330, 1997

Gonos, E.S., Derventzi, A., Agiostratidou, G. et Parmijt, S.J. Cloning and Identification of Genes that are Associated with Mammalian Replicative Senescence. *Exp. Cell Res.* **240**, 66-74, 1998

Hiyama, H., Iavarone, A. et Reeves, S.A. Regulation of the cdk Inhibitor p21 Gene During Cell Cycle Progression is Under the Control of the Transcription Factor E2F. *Oncogene* **16**, 1513-1523, 1998

Holliday, R. Toward a Biological Understanding of the Ageing Process. *Perspec. Biol. Med.* **32**, 109-123, 1988

Kirkwood, T.B.L., Adams, C., Gibbons, L., Hewitt, C.D., Kapahi, P., Kowald, A., Leeming, G., Lithgow, G.J., Martin, K., Potten, C.S. et Shanley, D.P. Cell Maintenance and Stress Response in Ageing and Longevity In: *Molecular Gerontology* Rattan, S.I.S. & Toussaint, O. Eds 193-200, New York, Plenum Press, 1996

Lee, H.-C., Pang, C.-Y., Hsu, H.-S. et Wei, Y.-H. Differential Accumulation of 4,977 bp Deletion in Mitochondrial DNA of Various Tissues in Human Ageing. *Biochim. Biophys. Acta* **1226**, 37-43, 1994

Lee, H.-C., Weindruch, R. et Aiken, M.J. Age-associated Alteration of the Mitochondrial Genome. *Free Rad. Biol. & Med.* **22**, 1259-1269, 1997

Lestienne, P. Mitochondrial DNA Mutations in Human Diseases: a Review. *Biochimie* **74**, 123-130, 1992

Lezza, A.M.S., Boffoli, D., Scacco, C., Cantatore, P. et Galaletta, M.N. Correlation Between Mitochondrial DNA 4977 bp Deletion and Respiratory Chain Enzyme Activities in Aging Human Skeletal Muscles. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **205**, 772-779, 1994

Liu, V.W.S., Zhang, C. et Nagley, P. Mutations in Mitochondrial DNA Accumulate Differentially in Three Human Tissues During Ageing. *Nucleic Acids Res.* **26**, 1268-1275, 1998

Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P. et Darnell, J. *Mol. Cell Biol.* New York, Scientific American Book, 1995, pp 1187

Magnuson, V.L., Young, M., Schattenberg, D.G., Mancini, M.A., Chen, D., Steffensen, B. et Klebe, R.J. The Alternative Splicing of Fibronectin Pre-mRNA Is Altered During Aging and in Response to Growth Factors. *J. Biol. Chem.* **266**, 14654-14662, 1991

Martin, M., Sprague, C.A. et Epstein, C.J. Replicative Life-Span of Cultivated Human Cells. Effects of Donor's Age, Tissue and Genotype. *Lab. Invest.* **23**, 86-92, 1970

Michel, D., Chatelain, G., North, S. et Brun, G. Stress-Induced Transcription of the Clusterin/Apo J Gene. *Biochemistry* **328**, 45-50, 1997

Mocali, A., Caldini, R., Chevanne, M. et Paoletti, F. Induction, Effects, and Quantification of Sublethal Oxidative Stress by Hydrogen Peroxide on Cultured Human Fibroblasts. *Exp. Cell. Res.* **216**, 388-395, 1995

Oostra, R.-J., Van Galen, M.J.M., Bolhuis, P.A., Bleeker-Wagelmakers, E. et Van Den Bogert, C. The Mitochondrial DNA Mutation ND6*14,484c Associated with Leber Hereditary Optic Neuropathy, Leads to Deficiency of Complex I of the Respiratory Chain. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **215**, 1001-1005, 1995

Oda, T., Wals, P., Ostreburg, H.H., Johnson, S.A., Pasinetti, G.M., Morgan, T.E., Rozovsky, I., Stine, W.B., Sydnor, S.W., Holznar, T.F. Clusterin (Apo J) Alters the Aggregation of Amyloid β -peptide (A Beta 1-42) and Forms Slowly Sedimenting A Beta Complexes that Cause Oxidative Stress. *Exp. Neurol.* **133**, 22-31, 1995

Ozawa, T., Sugiyama, S., Tanaka, M. et Haltori, K. Mitochondrial DNA Mutations and Disturbances of Energy Metabolism in Myocardium. *Japan. Circ. J.* **55**, 1158-1164, 1991

Pang, C.-Y., Lee, H.-C., Yang, J.-H. et Wei, Y.-H. Human Skin Mitochondrial DNA Deletions Associated with Light Exposure. *Arch. Biochem. Biophys.* **312**, 534-538, 1994

Picksley, S.M. et Lane, D.P. p53 and pRB: Their Cellular Roles *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 853-856, 1994

Rawn, J.D. *Biochimie* Paris, De Boek-Wesmael, 1990, pp 1145

Robles, S.J. et Adami, G.R. Agents that Cause DNA Double Strand Breaks Lead to p16 (INK4) Enrichment and the Premature Senescence of Normal Fibroblasts. *Oncogene* **16**, 1113-1123, 1998

Sambrook, J., Fritsch, E.F. et Maniatis, T. *Molecular Cloning A Laboratory Manual* New-York, 2nd Edition, Cold Spring Laboratory Press, 1989

Sellers, W.R., Novitch, B.G., Miyake, S., Heith, A., Otterson, G.A., Kaye, F., Lassar, A.B. et Kaelin, W.G. Stable Binding to E2F is Not Required for the Retinoblastoma Protein to Activate Transcription, Promote Differentiation, and Suppress Tumor Cell Growth. *Genes Dev.* **12**, 95-106, 1998

Shen, W.H. et Hohn, B. DMSO Improves PCR Amplification of DNA with Complex Secondary Structure. *Technical Tips* **8**, 227, 1992

Stone, D.J., Rozovsky, I., Morgan, T.E., Anderson, C.P., Finch, C.E. Increased Synaptic Sprouting in Response to Estrogen via an Apolipoprotein E-Dependent Mechanism: Implications for Alzheimer's Disease. *J. Neurosci.* **18**, 3180-3185, 1998

Tommasino, M. et Crawford, L. Human Papillomavirus E6 and E7: Proteins which Deregulate the Cell Cycle. *BioEssays* **17**, 509-518, 1995

Toussaint, O., Houbion, A. et Remacle, J. Aging as a Multi-Step Process Characterized by a Lowering of Entropy Production Leading the Cell to a Sequence of Defined Stages. II. Testing Some Predictions on Aging Human Fibroblasts in culture. *Mech. Ageing Dev.* **65**, 65-83, 1992

Toussaint, O., Houbion, A. et Remacle, J. Effects of Modulations of the Energetic Metabolism on the Mortality of Cultured Cells. *Biochem. Biophys. Acta* **1186**, 209-220, 1994

Toussaint, O., Raes, M., Michiels, C. et Remacle, J. La Réponse des Cellules aux Stress: Relation entre le Processus de Vieillesse et la Pathologie. *Méd./Sci.* **14**, 622-35, 1998

Toussaint, O., Raes, M. et Remacle, J. Aging as a Multi-step Process Characterized by a Lowering of Entropy Production Leading the Cell to a Sequence of Defined Stage. *Mech. Ageing Dev.* **64**, 45-64, 1991

Varizi, H., West, M.D., Allsopp, R.C., Davison, T.S., Wu, Y.S., Arrowsmith, C.H., Poirier, G.G. et Benchimol, S. ATP-Dependent Telomere Loss in Aging Human Diploid Fibroblasts and DNA Damage Lead to the Post-Translational Activation of p53 Protein Involving poly(ADP-ribose) Polymerase. *EMBO J.* **16**, 6018-6033, 1997

Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Döcke, W. et Lotze, C. Mild Hyperoxia Shortens Telomeres and Inhibits Proliferation of Fibroblasts: A Model for Senescence ? *Exp. Cell Res.* **220**, 186-193, 1995

Wallace, D.C. Mitochondrial Genetics: A Paradigm for Aging and Degenerative Diseases. *Science* **256**, 628-632, 1992

Wallace, D.C. ADN Mitochondrial, Maladies et Vieillissement. *Pour la Science* **240**, 52-60, 1997

Watson, J.D., Hopkins, N.H., Roberts, J.W., Argetsinger Steitz, J. et Weiner, A.M. *Biologie Moléculaire du Gène*, Menlo Park, InterEditions, 1989

Wilson, C.S.A. et Schwarzbauer, J.E. Changes in Cell Spreading and Cytoskeletal Organization are Induced by Adhesion to a Fibronectin Matrix. *Blood* **88**, 158-196, 1996

Yang, J.H., Lee, H.C., Lin, K.J. et Wei, Y.H. A Specific 4977 bp Deletion of Mitochondrial DNA in Human Ageing Skin. *Arch. Dermatol. Res.* **286**, 386-390, 1994

Yen, T.-Z., Su, J.-H., King, K.-L. et Wei, Y.-H. Ageing-Associated 5 kb Deletion in Human Liver Mitochondrial DNA. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **178**, 124-131, 1991

Zwicker, J., Liu, N., Engeland, K., Lucibello, F.C. et Müller, R. Cell Cycle Regulation of E2F Site Occupation *in vivo*. *Science* **271**, 1595-1597, 1996

BUMP



0 0 7 8 4 8 6 0 2

*FM B04/1998/12

